



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Brucella* MEDIANTE PCR
MÚLTIPLE EN QUESOS ARTESANALES NO PASTEURIZADOS EN
MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUEBLA”**

TESIS PARA OBTENER TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB. CRISTINA YADIRA GARCÍA PANAYETA

REALIZADO EN:

LABORATORIO DE PATOGENICIDAD MICROBIANA DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS ICUAP-BUAP

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. FABIOLA AVELINO FLORES

ASESOR INTERNO:

M.C. OSCAR PÉREZ TORIZ



AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por su apoyo al proyecto "Implementación de técnicas moleculares para la detección rápida y específica de *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus* y *Brucella* en diferentes alimentos III parte. Y dar la oportunidad a jóvenes que como yo, tenemos deseos de realizar proyectos que enriquezcan nuestro conocimiento, por inculcar en la comunidad estudiantil la investigación como fuente de desarrollo dentro de nuestra casa de estudios.

A mi directora de tesis D.C. Fabiola Avelino Flores, mi más amplio agradecimiento por aceptar guiarme en este proyecto, por su apoyo y confianza en mi trabajo, por su tiempo, dedicación, experiencia y conocimientos en la elaboración de esta tesis, porque me anima a seguir adelante preparándome día a día y porque a pesar de las circunstancias siempre me ha permitido demostrar mis conocimientos y mi esfuerzo.

A mi asesor de tesis M.C. Oscar Pérez Toriz mi especial agradecimiento por el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas, me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada, por su constante y paciente seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente proyecto.

A la D.C. Elsa Iracena Castañeda Roldan por su especial asesoría en este proyecto, por su paciencia, interés y amplia sabiduría enfocada en este proyecto, por compartir sus conocimientos en el área de una manera admirable.

A mis sinodales M.C. Alejandro Ruiz Tagle, D.C. Elsa Iracena Castañeda Roldan, M.C. Patricia Suarez Albores por sus valiosas sugerencias. Gracias por todo su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

Al Centro de Detección Biomolecular por el gran apoyo brindado en la realización de este proyecto, por facilitar de la manera más amable sus recursos para la mejora del mismo.



A la D.C. Elda Carreón por su amable y valiosa ayuda, por sus consejos y enseñanzas.

A mi hermana y mejor amiga Abigail, que con sus consejos me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida, por estar ahí siempre protegiéndome y demostrándome su cariño.

A mi tía Silvia por sus tiernos consejos, comprensión, ayuda en los momentos difíciles e inagotable amor.

A Yazmín Reyes Reyes por su infinito apoyo en este proyecto, por inculcarme conocimiento en este método y por su excelente calidad humana.



CONTENIDO		Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Género <i>Brucella</i>	3
3.1.1. Estructura y composición química	4
3.1.2. Genoma de <i>Brucella</i>	5
3.1.3. Gen <i>bp26</i>	7
3.1.4. Gen <i>wboA</i>	8
3.1.5. Gen <i>omp31</i>	9
3.1.6. Gen <i>eryC</i>	10
3.1.7. Gen CRP	11
3.2. Hábitat	11
3.3. Reservorios	12
3.4. Enfermedades transmitidas por alimentos	13
3.5. Fuentes y mecanismos de contaminación	13
3.6. Factores extrínsecos e intrínsecos importantes en el establecimiento de la enfermedad	14
3.7. Patogenia	14
3.8. Características de la enfermedad	15
3.9. Tratamiento	16
3.10. Medidas de control	17
3.11. Quesos	18
3.11.1. Definición	18
3.11.2. Clasificación de acuerdo al tipo de fabricación	16
3.11.3. El queso como reservorio de <i>Brucella</i>	18
3.11.4. Métodos diagnósticos de <i>Brucella</i> en leche y sus derivados	19
3.11.4.1. Microbiológico	19
3.11.4.2. Inmunológico	20
3.11.4.3. Identificación de <i>Brucella</i> mediante PCR	20
3.12. PCR	20
3.12.1. Etapas de la PCR	22
3.13. Electroforesis en gel de agarosa	23
3.13.1. Tampón de electroforesis	23
3.13.2. Concentración de agarosa	24
3.13.3. ADN marcador	24
4. Marco de referencia	25
5. Planteamiento del problema	27
6. Justificación	28
7. Objetivos	29



8. Metodología.....	30
8.1. Estandarización de la PCR utilizando cepas tipo.....	30
8.1.1. Descongelamiento y aislamiento de cepas de <i>Brucella</i> utilizadas como control positivo.....	30
8.1.2. Confirmación de cepas del género <i>Brucella</i>	30
8.1.2.1. Extracción de DNA bacteriano de cepas de <i>Brucella</i>	30
8.1.2.2. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de DNA de cepas control.....	30
8.1.2.3. Detección del gen <i>bp26</i>	31
8.2. Estandarización de técnica de PCR múltiple utilizando cepas tipo.....	31
8.2.1. Confirmación de especies de <i>Brucella</i>	31
8.2.2. Determinación de concentración y pureza del DNA extraído de las cepas control.....	33
8.2.3. inoculación de quesos de leche de cabra y vaca con <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	33
8.3. Procesamiento de los quesos.....	34
8.3.1. Selección de los mercados muestreados.....	34
8.3.2. Extracción de DNA bacteriano de quesos.....	37
8.3.3. Selección tamiz de DNA de muestras de quesos por PCR para detectar al gen <i>bp26</i>	38
9. Resultados.....	39
9.1. Estandarización de la PCR múltiple utilizando cepas tipo.....	39
9.1.1. Descongelamiento y aislamiento de cepas de <i>Brucella</i> utilizadas como control positivo.....	39
9.1.2. Extracción de DNA bacteriano de cepas de <i>Brucella</i>	40
9.1.3. Confirmación de especies de <i>Brucella</i>	41
9.1.4. Determinación de concentración y pureza del DNA extraído de las cepas control.....	43
9.1.5. inoculación de quesos de leche de cabra y vaca con <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	47
9.2. Procesamiento de los quesos.....	51
10. Discusión de resultados.....	53
11. Conclusiones.....	55
12. Bibliografía.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i>	4
FIGURA 2. Clasificación funcional de <i>B. abortus</i> , mostrando la distribución de genes según sus funciones biológicas.....	6
FIGURA 3. Alineamiento de ambos cromosomas de nueve genomas completos de <i>Brucella</i>	7
FIGURA 4. Componentes necesarios en una PCR.....	21
FIGURA 5. Pasos que constituyen el ciclo de la PCR.....	23
FIGURA 6. Mapa de la ciudad de Puebla en donde se muestran los mercados muestreados.....	34
FIGURA 7. Porcentaje de quesos analizados por mercados.....	35
FIGURA 8. Grafica que muestra el número de quesos por procedencia.....	37
FIGURA 9. Crecimiento de <i>Brucella abortus</i> S19 a las 48 horas en agar BRUCELLA-BUAP.....	39
FIGURA 10. Crecimiento de <i>Brucella melitensis</i> M16 a las 48 y 72 horas en agar BRUCELLA-BUAP.....	39
FIGURA 11. DNA de especies de <i>Brucella</i> utilizadas como control positivo.....	40
FIGURA 12. Identificación del gen <i>bp26</i> en DNA de las cepas control <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	41
FIGURA 13. Diferenciación de cepas de <i>Brucella</i> relacionadas con infección en el ganado bovino por PCR múltiple.....	42
FIGURA.14 Concentración y pureza de DNA extraído de cepas de <i>Brucella</i> utilizadas como control. A) <i>Brucella abortus</i> B) <i>Brucella melitensis</i>	43
FIGURA 15. PCR múltiple de diferentes concentraciones de DNA de <i>Brucella abortus</i>	45
FIGURA 16. PCR múltiple de diferentes concentraciones de DNA de <i>Brucella melitensis</i>	46
FIGURA 17. DNA bacteriano de quesos inoculados con <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	47
FIGURA 18. DNA concentrado de los quesos inoculados.....	48
FIGURA 19. Identificación del gen <i>bp26</i> en quesos de cabra y vaca inoculados con <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	49
FIGURA 20. PCR múltiple de DNA bacteriano de quesos de cabra y vaca inoculados con <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i>	50
FIGURA 21. DNA bacteriano de quesos frescos de leche de vaca.....	51
FIGURA 22. Identificación del gen <i>bp26</i> en quesos de vaca.....	52



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Supervivencia de <i>Brucella</i> en el medio ambiente.....	12
TABLA 2. Supervivencia de <i>Brucella</i> en leche y diferentes derivados lácteos.....	18
TABLA 3. Supervivencia de <i>Brucella</i> en diferentes quesos.....	19
TABLA 4. Resultados de la PCR múltiple realizado por Sullivan y colaboradores.....	25
TABLA 5. Resultados de la PCR múltiple realizado por López Goñi y colaboradores.....	26
TABLA 6. Composición de la mezcla de reacción a emplear en la técnica de PCR.....	31
TABLA 7. Iniciadores empleados para la identificación de especies de <i>Brucella</i> y tamaño de los productos de amplificación.....	32
TABLA 8. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR múltiple para la confirmación de especies de <i>Brucella</i>	32
TABLA 9. Número de muestras por mercado.....	35
TABLA 10. Procedencia de los quesos muestreados en la ciudad de Puebla.....	36
TABLA 11. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR para la detección del <i>gen bp26</i> en DNA bacteriano extraído de quesos de leche de vaca.....	38
TABLA 12. Genes amplificados a las diferentes concentraciones de DNA bacteriano de las cepas utilizadas como control positivo.....	44



1. RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella* que son patógenos intracelulares facultativas, anualmente se reportan alrededor de 500,000 casos humanos, el consumo de derivados lácteos como lo es el queso fresco de leche de vaca representa un vehículo importante de la transmisión de la enfermedad de los reservorios al ser humano. El objetivo general de este proyecto fue Identificar especies de *Brucella* por el método de PCR múltiple en quesos artesanales no pasteurizados obtenidos de la ciudad de Puebla para sugerir cuál es la prevalencia de esta bacteria en quesos frescos en mercados de la ciudad de Puebla y cuál de sus especies es la más frecuente detectada mediante la técnica de PCR múltiple.

Se muestrearon 15 de 19 mercados totales de la ciudad de Puebla lo que representa el 55.5%, se obtuvieron quesos no pasteurizados a base de leche de vaca para la identificación de especies de *Brucella* por el método de PCR múltiple. A los quesos se les extrajo el DNA bacteriano mediante el kit Quick-gDNA MiniPrep, para posteriormente someter el DNA obtenido a una PCR la cual se realizó empleando una mezcla de reacción comercial (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA) para la identificación del gen *bp26* como una prueba tamiz ya que este gen se encuentra presente en todas las especies de *Brucella*, los genes empleados para la PCR múltiple fueron los genes *wboA*, *eryC*, *omp31*, *rspL* y *crp*. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.25%, el cual se sometió a 90 volts durante 1 hora en buffer TAE 1X (0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA pH 8.0). Para estimar la longitud del fragmento de ADN se utilizó el marcador de peso molecular de 1000 pb (Gene Ruler™ 1000bp DNA Ladder FERMENTAS). El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio a una concentración de 5µg/ml durante 5 minutos y posteriormente el material genético se visualizó en el transiluminador UV.

Se estandarizó la técnica de PCR múltiple para *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 en quesos a base de leche de vaca no pasteurizados. Se inocularon quesos de leche de vaca y de leche de cabra con *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 utilizadas como control positivo para verificar la especificidad del método.

Se determinó la sensibilidad de la PCR múltiple en *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 realizando diluciones del DNA de estas mismas cepas resultando 6 ng/µL para *Brucella abortus* S19 y de 5.9 ng/µL para *Brucella melitensis* M16.

No se detectó *Brucella* en las 50 muestras de DNA de los quesos muestreados mediante la técnica de PCR.

2. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial cuya incidencia y prevalencia varía de un país a otro; es producida por bacterias del género *Brucella*, que son patógenos intracelulares facultativos que originan una enfermedad infectocontagiosa del tracto genitourinario de sus reservorios naturales, animales silvestres y domésticos como cabras, vacas, borregos, cerdos y perros, entre otros. El hombre incidentalmente adquiere la enfermedad a través del contacto directo con animales infectados o al consumir productos como leche o queso fresco sin que estos lleven un proceso de pasteurización; se le denomina fiebre de Malta, del Mediterráneo o melitococia; es una enfermedad sistémica que puede involucrar cualquier órgano o sistema del cuerpo; al año se reportan mundialmente más de 500,000 nuevos casos en humanos (Pappas y cols., 2005). Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos, México, Brasil, Perú, Colombia y Argentina) (Adams G, 1997).

La presencia de brucelosis es causa de importantes pérdidas económicas del ganado bovino así como en los productos lácteos que derivan de estos, sin embargo, los métodos serológicos para la identificación de las diferentes especies patógenas en distintos hospederos, así como la diferenciación de cepas vacúnales de estas especies, dificulta la capacidad de distinguir animales infectados de animales vacunados, lo que trae como consecuencia deficiencias en el control de la enfermedad, así como su comercio, promoviendo la permanencia o re-emergencia de esta zoonosis. En México la brucelosis existe desde finales del siglo XIX, se le adjudica a Pláceres la confirmación bacteriológica de *Brucella melitensis* en dos enfermos con fiebre de Malta en el estado de Puebla (Ruiz. 1986). El alto consumo de quesos artesanales no pasteurizados en el estado de Puebla representa un importante vehículo de transmisión de la brucelosis de los reservorios al hombre. En este trabajo se muestrearon varios mercados de la ciudad de Puebla para el estudio de quesos artesanales no pasteurizados y la identificación de especies de *Brucella* por el método de PCR múltiple, esto con la finalidad de tener una noción del control y prevención que se tiene en el ganado, potenciales transmisores de la enfermedad a otros animales y al humano al consumir productos contaminados.



3. MARCO TEÓRICO

La brucelosis existe desde finales del siglo XIX en el territorio nacional. El estudio detallado de los aspectos clínicos, epidemiológicos y epizootiológicos se realizó a partir de 1905. Se le adjudica a Pláceres la confirmación bacteriológica de *Brucella melitensis* en dos enfermos con fiebre de Malta en Puebla. A partir de entonces se inició la búsqueda de más casos en varias entidades del país y se estudió el aspecto epidemiológico (Ruiz, 1986).

La primera descripción del género la realizaron Meyer y Shaw en 1920; la clasificación se basó en aspectos morfológicos, características culturales, bioquímicas, serológicas y de fagotipia, junto con la especificidad relativa hacia ciertos hospederos (Corbel y Brinley-Morgan, 1984). Desde entonces esta clasificación ha sido ampliamente usada en el mundo para propósitos diagnósticos y epidemiológicos.

3.1. GÉNERO *Brucella*

El género *Brucella* es un grupo de bacterias Gram negativas que presentan forma de bacilos cortos de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y de 0.5 a 1.5 μm de largo, se observan aislados, en pares, en cadenas cortas o grupos. Al emplear la tinción de Zielh-Neelsen modificada (tinción de Stamp), las brucelas se tiñen de color rojo y conservan la misma morfología; no producen capsula verdadera, endosporas y son inmóviles. Son aeróbicas, con un sistema transportador de electrones basado en citocromos, que emplean al O_2 o al nitrato como aceptores finales de electrones. Muchas cepas requieren CO_2 suplementario, especialmente en el primo aislamiento. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C , aunque pueden crecer a temperaturas de entre 20 y 40°C . El pH óptimo para su crecimiento es de 6.6-7.5 (Corbel, 1989; Holt y cols., 1994).

Poseen un metabolismo oxidativo; son catalasas y oxidasas positivas. No utilizan el citrato como fuente de carbono ni desdobla el indol de la molécula de triptófano. Son bacterias quimioorganótrofas que requieren medios complejos para su desarrollo que contengan aminoácidos, tiamina, niacina, biotina e iones magnesio, algunas cepas crecen mejor con suero o sangre pero no requieren hemina (factor-X) ni adenina nicotidamina dinucleotido (factor-V), no producen hemólisis. (Corbel, 1989)

3.1.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

Estructura externa:

La membrana externa de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina. Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Figura 1). En base a la expresión del LPS las colonias de *Brucella* obtenidas en medio sólido pueden tener diferentes aspectos; cuando el PSO se encuentra ausente o presente en pocos residuos en el LPS, las colonias adquieren un aspecto rugoso, mientras que si el PSO es abundante el aspecto de las colonias es liso, y son estas cepas más virulentas (Zygmunt, 2009)

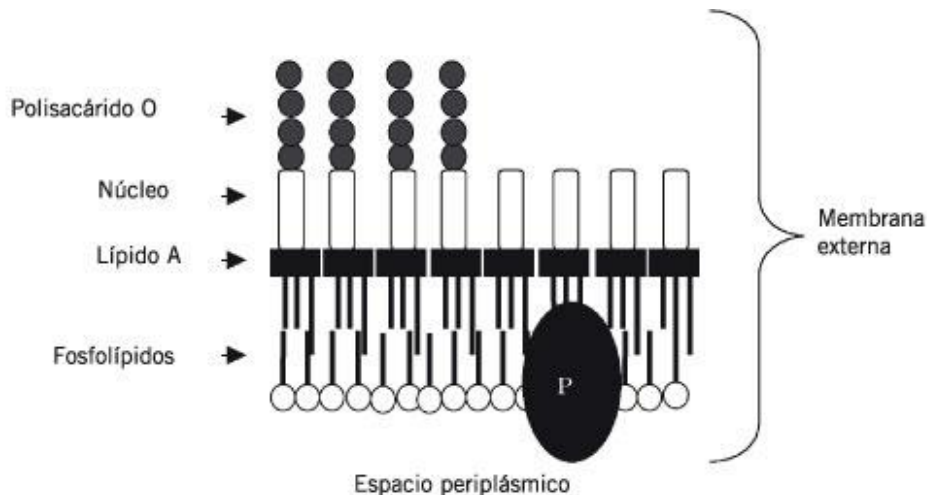


Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O o está reducida a muy pocos residuos. P: proteína. (Castro y cols, 2005)

Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que son las más abundantes y se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa), algunas de ellas identificadas y caracterizadas como porinas (Omp25, Omp31, Omp2b) (Salhi I y cols., 2003.) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosa. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas identificadas como Omp10,



Omp16 y Omp19. Existen estudios que sugieren que las OMPs son posibles inductores de la respuesta inmune del hospedero cuando se presentan infecciones por *Brucella* (Cloekaert A. y cols., 1999).

Estructura interna:

La mayoría de las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* son compartidas por todas las especies del género. Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termorresistente, una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección y la proteína periplásmica *bp26* de la cual se identificará en este proyecto.

3.1.2. Genoma de *Brucella*

El genoma de *Brucella* tiene un tamaño total aproximadamente de 3.2 megabases (Mb) (Sánchez, 2001) y está conformado por dos cromosomas circulares (Cr) independientes. El cromosoma 1 (CrI) es el más grande, con un tamaño medio de 2.1Mb y el cromosoma 2 (CrII) tiene un tamaño medio de 1.2 Mb. Ambos tienen un contenido similar de G-C, de aproximadamente 57.1% en promedio para el CrI y de 57.3% para el CrII. El número total de genes es de aproximadamente 3,460 de los cuales alrededor de 3,180 son genes que codifican para proteínas con diversas funciones fisiológicas y metabólicas (Figura 2), el CrI es donde se encuentran la mayoría de los genes esenciales (Sánchez, 2001; Halling, 2005; Wattam, 2009)

El genoma de *Brucella* conserva un 90% de homología entre sus especies (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) siendo mayor la homología en el CrI que en el CrII (Figura 3), esto fue demostrado por estudios de hibridación DNA-DNA y comparación de la secuencia de la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico (RNAr) entre estas especies (Godfroid, 2005). Sin embargo la existencia de fragmentos únicos en ambos genomas de las distintas especies (Paulsen, 2002) permite el desarrollo de ensayos rápidos y específicos para la identificación molecular de todas las especies conocidas de *Brucella* (García, 2006)

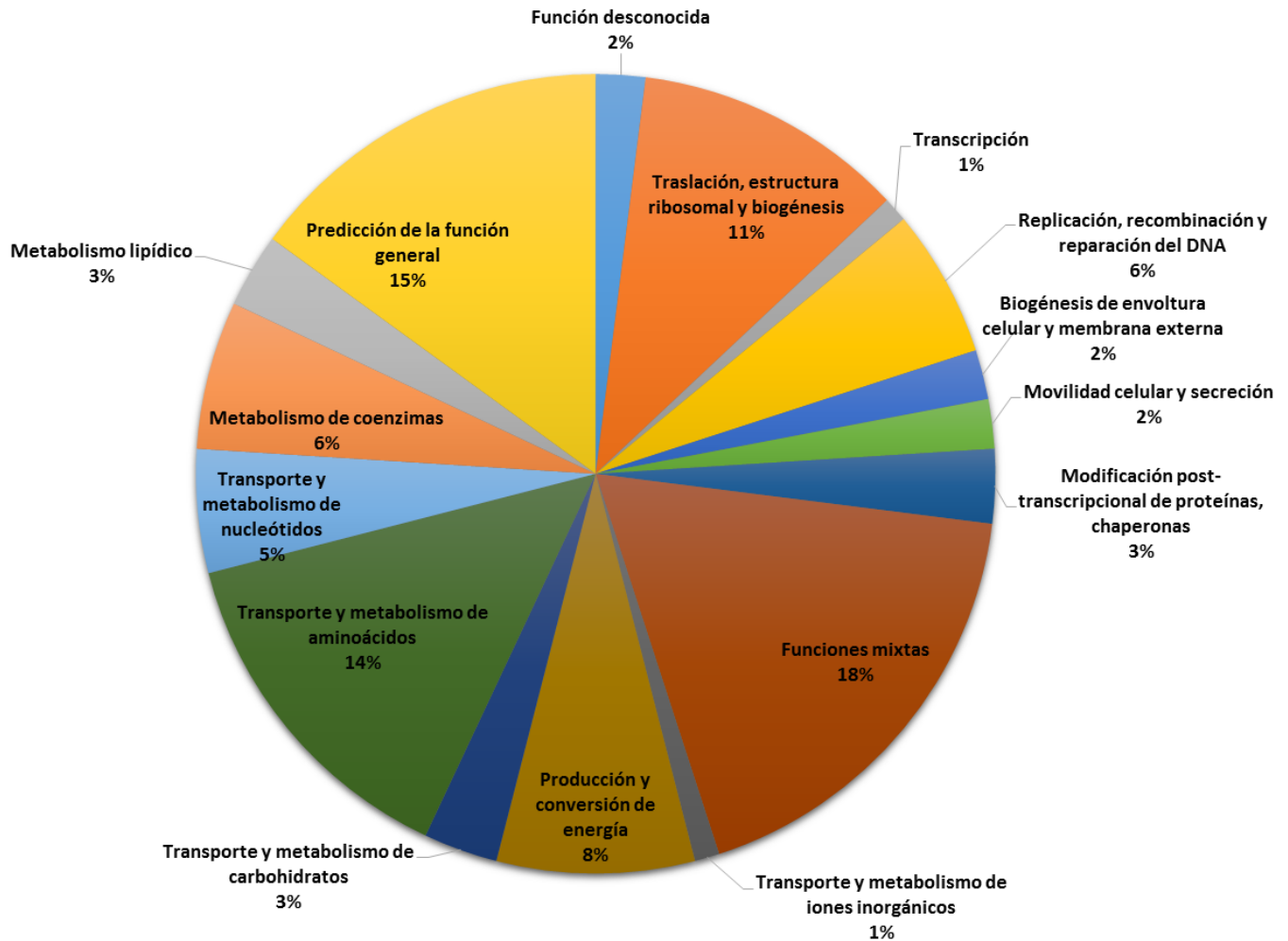


Figura 2. Clasificación funcional de *B. abortus*, mostrando la distribución de genes según sus funciones biológicas. Los genes que fueron clasificados en más de una categoría se incluyeron en el grupo de funciones mixtas.

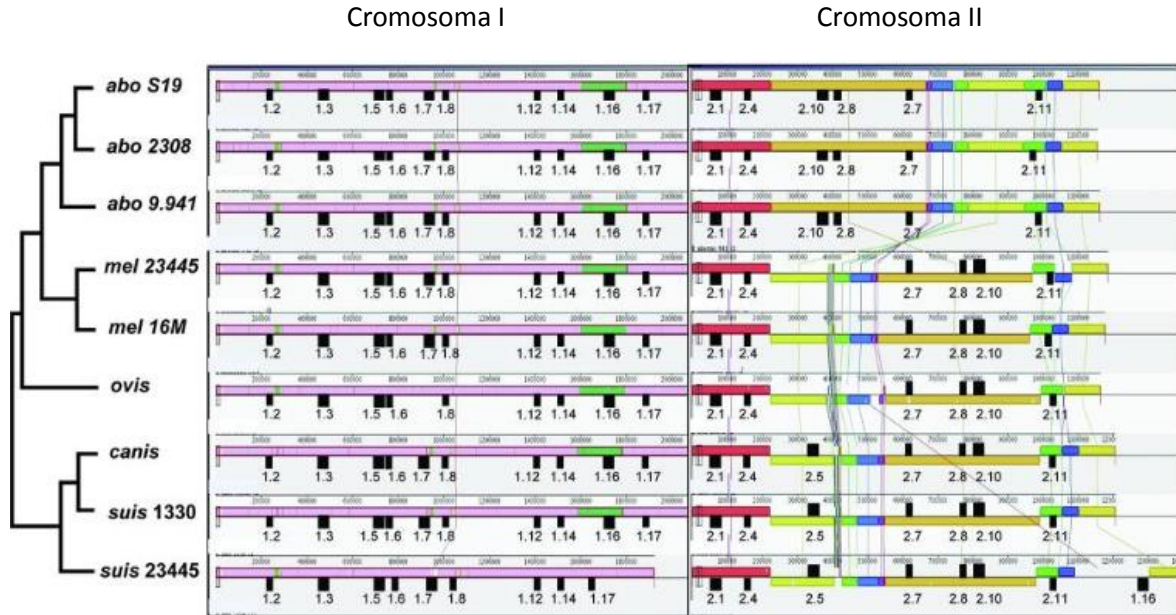


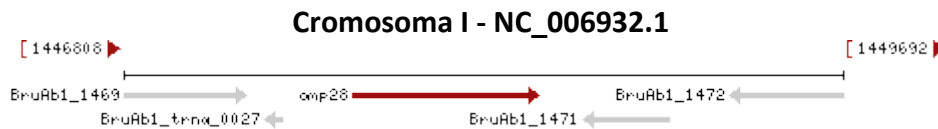
Figura 3. Alineamiento de ambos cromosomas de nueve genomas completos de *Brucella*, donde se muestra la mayor homología encontrada en el CrI entre las especies que en el CrII (Wattam, 2009).

3.1.3. GEN *bp26*

El gen *bp26* que codifica a la proteína Omp28 se encuentra en el periplasma de *Brucella* y ha sido identificada como un importante antígeno diagnóstico de brucelosis. Esta proteína es altamente conservada entre *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. melitensis* y es ampliamente utilizada como un marcador de diagnóstico y de vacunación contra la brucelosis.

La proteína Omp28 es un antígeno protector excelente e inductor de respuestas celulares induce no sólo títulos altos de IgG, sino también, la respuesta celular de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-6. (Jinlang Qiu y cols., 2012)

SECUENCIA DEL AMPLICON OBTENIDO PARA LA DETECCION DEL GEN *bp26* en *Brucella*





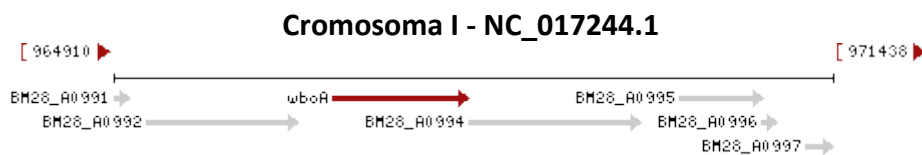
GCCCCTGACATAACCCGCTTTGTCCAAATTTTTTCAACTTTTCCTGTAGGAGATTTTATGAACACTC
GTGCTAGCAATTTTCTCGCAGCCTCATTTCACAATCATGCTCGTCCGGCGCTTCAGCCTGCCCGC
TTTCGCACAGGAGAATCAGATGACGACGCAGCCCGCGGCATCGCCGTACCCGGGGAAGGCATG
ATGACGGCCTCGCCGATATGGCCATTCTCAATCTCTCGGTGCTACGCCAGGCAAAGACCGCGCG
CGAAGCCATGACCGCGAATAATGAAGCCATGACAAAAGTGCTCGATGCCATGAAGAAGGCCGGC
ATCGAAGATCGCGATCTCCAGACAGGCGGCATCAATATCCAGCCGATTTATGTCTATCCTGACGAC
AAGAACAACCTGAAAGAGCCTACCATCACCGGCTATTCTGTATCCACCAGTCTCACGGTTCGCGTG
CGCGAAGTGGCCAATGTTGGAAAAATTTGGATGAATCCGTACGCTCGGTGTTAATCAGGGCGG
TGATTTGAACCTGGTCAATGATAATCCCTCCGCGTGATCAACGAGGCGCGCAAGCGCGCAGTGG
CCAATGCCATTGCCAAGGCGAAGACGCTTGCCGACGCTGCAGGCGTGGGGCTTGCCCGTGTGGT
GGAAATCAGTGAAGTGAAGCCCGCCCATGCCGATGCCAATTGCGCGCGGACAGTTCAGAACCA
TGCTAGCAGCCGCACCGGACAATTCCGTGCCGATTGCCGCGAGGCGAAAACAGCTATAACGTATCG
GTCAATGTCGTTTTTCAAATCAAGTAAATAGCCGGGGTATGACGCCCTTGGCACCTGATACAAAA
CGCCGGCCTGTTTTACAGGCGCGTTTTTTGATTAGAGCGCGTTTTCGATCTGATTGAATCCGATC
GGCGCTAATCCTTTGTTTTGACGCGCATCTTTCCGAAAACCGTTTCACACTTTTCGGGATGCGG
TCTAGCGGATGATCGGGCAACCGCGGTATCGGCAAATGTCACGCTC

Tomado de: Banco de genes de ncbi.

3.1.4. GEN *wboA*

El gen *wboA* codifica para una glicosil transferasa esencial en la biosíntesis del lipopolisacárido antigénico "O" ausente en la cepa vacunal RB51, ha sido empleado para distinguir la cepa vacunal de *Brucella abortus* RB51 de otras cepas de *Brucella* a partir de aislamientos (Vemulapalli y cols.).

SECUENCIA DEL AMPLICON OBTENIDO PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *wboA* en *Brucella*



ATGGCTCCGAGACATATTACAGTTATCCTACCAGCTAAGTACCGAGGCGGAAGTCTTCGAACTAC
GAAGAATATCGTTTCAATGCTTTTGAAGGGAAGTCAAGATTATGGTGAACAGTGTCAAGTTAGAT
TGCGAGTACGTGCCGATACCTACGATATTGGGGAGGAGTTTCGTGATCTTATCGATAATGGTGTA
GAGGTTCCGGGAAATATCATTCAAAGAAGTTCCTCCAGAAGATGTTAACAATGCTAACTATTTCAA
GGTAGAAATATCGACCTACAGTTCGAGAACCTATTGGCTAATGGAGGATGGCCAAAACAAGTGTGC
CGATAGTGACCTTTGGCTAGTTGTATCCTACTCTGTAGAGTATCCTATTGCCCGATAAGGCCGAC
ACTGATATTTGCCACCGATTTTCAATCAAAGGTACGTACCTGATATTATTTGGCCACCACGGCCCGGT

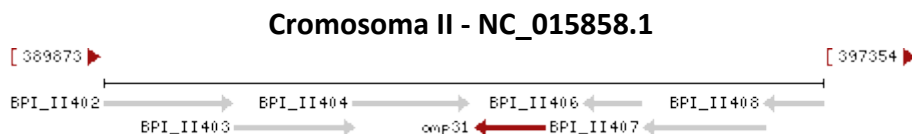
GAGGGGGATGCTGAGGCTCTTGC GTTCTTACGACAATCAGACGGCGTACTAGCTACAACACCACA
CACGCGGCTGGATGCGATTTTCATACGCTGGCTTACCTGCGTCCAAAGTTTATCTTGCTCCGATGGA
GTTTGACCCGACGTTTTTGGATCGTTACCGGTCAGTGTCTAAGGTTAAGGAACCCCTATTTCTTTG
GCCAACCAACCCAAATGCTCACAAAAACCATGCAAAAGCGTTTTCAAGCGCTAGACCTATATTACGG
CAAATAAGGGTAAGATAAAGACAAAGATAGTCGGTGTGAGTAGTGTGCGGATGGACCCATCC
CATCGATGGCAGGCCAAGTACGAAAATAAGGCTTATGTGAAATCTGTACGGGAAATTGTTGCGG
GTCTCGACAACCTGAAAAGCAATGTTGAGTTCGCTGGTGTGAGGTTGCGGACAAGGAGTATGCGGA
GCTTCTTGCTTCAGCTTGTTCCTTTGGCATCCAACCTTTGGCAGACAACGGAACCTTTTGCTGCGGTC
GAAGCGGCATATATGGGATGTCCAACGCTTTCAAACGACTACCCGCAGATGCGGTATATTTCTAAC
CGTTTCGAAATCCCATGCAGTATTTAACGCAAGGTCTGTGAAGGAAATGGCATCAGCGCTTAAG
CAAATGGAGGAGACGCCAATAGATGTAGGTTTATTGCCAAGTCGAGAAACCCCTATCTCTGCATTC
GTGGGAAGCTCACGCTCCGAATACTGGGATGTGATCGTGAGGGCAGCGGCATGAATAAGCTCG
GCGTGTATATCGGCTATAACCCAGGCCAATTAGATCCATATCAGGGTATTTCTCGCTTAATTGCATT
CGTGATCAAGGGGGCCTTGAACCAGGGTAGCGGTGTAACAATTGCTTGCCCCGGCTGGCTAAAG
GACGATGTACGTGTTCTTTTGGAAAGATGCTGATATCCCACTTGAAGCGGTCAAATATATCGCGACG
AATGGTCAGCCTCATTGGCTTCGTTATGGAAGTTGAGAGATAAGTCCGTAAGAGACGGACGAG
TAAACGAAAACGTCTCTGGCTGGAGCGCTATGGCAAAAATGTTGCAAATTTTGTGAGAATGGC
TTTCTTCGCGCTCGTATTGGGGGATTTTTTTGGGGGCTGCTGCAATTGCTGTAGTGACTATTCTACT
TGCCGTACCAATTGCTATAGCCTTCACCGCTCTTATCGGTCTTCTATTTGCTCGTCGGCTTATTAGAC
GTGTTATCAGGTCAAAGCTTGTTTTGTTTTTCAAAAAATGCCAATCAATTCAACAAATTAATGTC
ATCTGATGAAACCATCGACCGGATGAGGGAACGGGAATTCTCATTGTTGATGAAGAAGATCAACG
CCCAGAAGGACATCAAAGTTTGGTATGTACCAGCCATGTTTTGGCCGAGGTCGCTAACATAAAA
TCCAAGATCGTGATGGCAGCCCCGGATATCGTCTTCTTCGATTACCCAGGGAACCTCCGAGGGATA
CGAGAGCATAACTCATATGATCGCATGTTAAAGAGCTTGAGGTCTGCCGATCATCTCGTTT **GCTAC**
AGTAAAATGCGAAGC

Tomado de: Banco de genes de ncbi.

3.1.5. GEN *omp31*

Codifica a la proteína 31, que es la proteína principal en la membrana externa de *Brucella melitensis*.

SECUENCIA DEL AMPLICON OBTENIDO PARA LA DETECCION DEL GEN *omp31* en *Brucella*





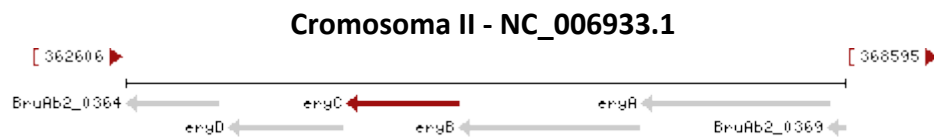
TTTACACAGGCAATCCAGCA AAGCCCGTACGCCAGCGGCGCAAAAACACAGATTATTCAATCCAC
CGGTTTTAAAGAATAAAACACATGCCCTCCTGGCGAAGCAGCACTGCGTCTGCCATTGAAAAAT
ATGATATGAAGCGCAACAATAAGTAGTAGAAAAATCCGGAGGCTTTGGGTTTTCGTTTAGAAGAA
AGTTTGGTTTCGCTGTTGAAATATGCAACTTTAAGCATTTTACTATAAAATTAGTGTGATTTT
AAACCCATCCCGCACCATGCGTTTTATAGTGGATTTATTTGATTTATGATCTTTATCCCCACTTAATT
GGTAAAAATCCCGTTAAAAATGCCCAATTGTAATTTTTCCCTTAATCAGCATTACAACGAGATGT
TGCATAAAAGTGACAGACTTTTTCGCCGAATGTGATTAGGTAAGCTTTGTCTAATTTACCTAGAGG
TTTAAAATGAAGTCCGTAATTTTGGCGTCCATCGCCGCTATGTTTCGCCACGTCCGCTATGGCTGCC
GACGTGGTTGTTTCTGAACCTTCCGCCCTACTGCTGCTCCTGTTGACACCTTCTCGTGGACCGGGC
GCTATATCGGTATCAACGCCGTTACGCAGGCGGCAAGTTCAAGCATCCATTTTCTAGCTTTGACA
AGGAAGACAACGAACAGGTTTCCGGTTCGCTCGACGTAACAGCTGGCGGCTTCGTGGTGGTGT
CAGGCCGTTACAACCTGGCAGCTCGACAACGGCGTCGTGCTCGGCGCGGAAACCGACTTCCAGG
GATCGAGCGTTACGGGTTTCGATTTACGCCGGTCCAGCGGTCTCGAAGGCAAAGCTGAAACCAA
GGTCGAGTGGTTCGGCACAGTTTCGTGCCCGTCTTGGCTACACGGCTACCGAACGCCTCATGGTTTA
TGGTACCGGCGGTCTGGCCTATGGTAAGGTCAAGTCTGCGTTCAACCTGGGTGATGATGCAAGTG
CCCTGCACACGTGGTCCGACAAGACGAAAGCTGGCTGGACCCTCGGCGCTGGTGTGAATATGC
ATCAACAACAACCTGGACGCTCAAGTCGGAATACCTCTACACCGACCTCGGCAAGCGCAACCTCGTC
GACGTTGACAATAGCTTCTTGAGAGCAAGGTCAATTTCCACACTGTTTCGCGTGGTCTGAACCTAC
AAGTTCTAA

Tomado de: Banco de genes de ncbi.

3.1.6. GEN *eryC*

También llamado TaD-eritrolosa-1-fosfato deshidrogenasa, es uno de los cuatro genes que forman parte de un operón (operón *ery*) para el metabolismo del eritritol.

SECUENCIA DEL AMPLICON OBTENIDO PARA LA DETECCION DEL GEN *eryC* en *Brucella*



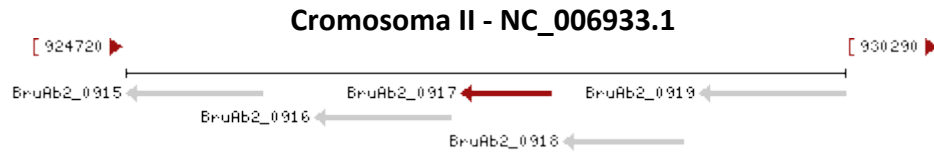
ATGGCCCTGACGCTTTTCGCTCAACACCAATCCGCTGGTCAACCGCTTTGCCGAGCCGGACGACCTG
ATCGAAACGGTTGCCCGGACCTGCGCCTGCGTGACCTCCAGCTTACCCATGAGTTTATCAATCCA
AGCTGGCAGGCCTCGACCATCCGCCGCTCACCCGCGACATGGACAGGGCCTTGCAGCGCACCGG
TGTCGCGTCACTCCGGCATGACCGGCCCTATGGCCGCTCAACATTTGGCCATCCCGACCG
GGACGTGC **GCCGCTATTATGTGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTATCGGGGATCTTGGCG**
GCAAGTCCGTCGGTACGCAGTTTGAATCTTACCTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCGCCGCG
AAGAACTTATCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAGGTGCGGG
CCTCGACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGGAATTTGGCGAGACGATTGCCGAAT
GCATGAAGCTTCAGGATCGGCTCACCGCCGCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGGCCGAT
ATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGGACGACTACGATCCTTACGCATGGGCCCGCAC
CGTGCCGAAAGTCTCGCCATCATCCATATCAAGCAAAGCCTGATGGACAAGGGCGGGCATCGTC

CTTTCACAGCCGCGTTCAATGCCAAGGGCCGCATCCAGCCGGAACCGCTTTTGAAAGCCTTTGCCG
AAGGCGGCGCGGTGGATAATGAAATCTGCCTTGAACCTTCGTTCAAGGAGCGCGAGCCGAACGA
CCGTGAAGTCATTCCACAGATTGCAGAAAGTGTGGCTTCTGGGCGCCGCACATTGACACCGGCG
CTAAGGACTTGAAGATATAG

Tomado de: Banco de genes de ncbi.

3.1.7. GEN *crp* (regulador transcripcional)

SECUENCIA DEL AMPLICON OBTENIDO PARA LA DETECCION DEL GEN *crp* en *Brucella*



CGCAGACAGTGACCATCAAACCCCGAACCATGACCTATCGCGCGGATGGGGATTTTCAGAAGAAT
AACTATCCGGTCGATGCGCCTTGACGACGCGCAAGCTTCGGCGATCCTTCGAGATCATGAAATAT
CAGGTAACGGGGGCTGAATAC

Tomado de: Banco de genes de ncbi.

Los genes *wboA*, *eryC* y *crp* fueron seleccionados por ser genes compartidos en las dos especies de *Brucella* que infectan al ganado bovino: *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, y el gen *omp31* fue seleccionado por ser el gen que diferencia entre estas dos especies.

3.2. HÁBITAT

Se ha reportado la presencia de *Brucella* en el medio ambiente, en el estiércol, paja, agua y hortalizas, en donde pueden permanecer durante periodos variables que dependen de la presencia de material orgánica y de la temperatura; no se considera que este tipo de vida libre en el ambiente, sea parte de su ciclo de vida. Bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad y protección contra el sol, las brucelas pueden sobrevivir en ambientes diversos por largos periodos, aunque no existe evidencia de que los organismos se repliquen significativamente en estas condiciones. Así en el suelo húmedo a 10°C sobrevive 66 días; en agua a -4°C, 114 días; en estiércol en verano un día, pero en invierno 53 días. (Tabla I)

**Tabla 1.** Supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente

MATERIAL	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37°C y ph 7,5	Menos de 1 día
Agua a 8°C y ph 6,5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8°C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

(Torres Vitela y cols., 2010)

3.3. RESERVORIOS

Los reservorios de *Brucella* son las especies domésticas: vacas, borregos, cabras, cerdos, perros y en menor escala caballos, burros y otros mamíferos propios de la zona. Los signos característicos de la brucelosis, en la mayoría de las hembras, son el aborto o los nacimientos prematuros y la retención de la placenta. La producción de leche disminuye con los nacimientos prematuros; la mayoría de las hembras abortan una vez, aunque algunas no son afectadas; la ubre a menudo se mantiene permanentemente infectada, sobre todo en cabras y vacas. Las diferentes especies de *Brucella* pueden producir orquitis (inflamación de testículo) o epididimitis (inflamación de escroto) en los machos (Nielsen y Duncan, 1990). Existe una preferencia de las brucelas por infectar a ciertas especies animales, *B. abortus* infecta principalmente al ganado bovino, aunque puede afectar y causar signos clínicos en otras especies animales. La brucelosis bovina, producida por *B. abortus*, es la más extendida en el mundo. En México la brucelosis caprina causa el 90% de los casos en humanos. Los reservorios animales preferidos de la especie *B. melitensis* son las cabras y los borregos, aunque otras especies animales no quedan exentas debido a su gran virulencia y contagiosidad. El reservorio de *B. suis*, hasta ahora reportado en México, es el cerdo, y el de los perros, *B. canis* (López Merino, 1989; Luna y Mejía, 2002)



3.4. EFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Son producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse e invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. La infección alimentaria se produce cuando el alimento contiene suficiente cantidad de microorganismos infecciosos, es decir, una determinada dosis infectante como para enfermar a una persona, que se considerará infectada. Microorganismos como las brucelas tienen la capacidad de diseminarse a otras partes del organismo, no permanecen en paredes del intestino y tampoco producen diarrea en un alto porcentaje de las personas infectadas. Entre los factores determinantes para la ocurrencia de las ETA'S se pueden citar los agrupados en factores de contaminación, supervivencia y proliferación. (Castro Domínguez y cols, 2001).

3.5. FUENTES Y MECANISMOS DE CONTAMINACIÓN

Los animales infectados son la principal fuente de propagación de *Brucella*, siendo las hembras grávidas las más importantes, las cuales al abortar o parir expulsan grandes cantidades de bacterias con el feto, líquido amniótico y las membranas fetales; las secreciones vaginales después del parto o mamas son el principal vehículo de contaminación de los corrales, camas o lugares donde pernoctan o abrevan. De esta forma se contaminan con facilidad, el suelo, los traspacios, los corrales, la paja de las camas, el agua de los arroyos, canales y pozos (Acha y Szyfres, 1986; Joint FAO/WHO, 1986; Lapaque y cols., 2005). La presencia de *B. melitensis* en bovinos es muy peligrosa por el gran volumen de leche infectada que se produciría por animal, y por la contaminación que se difundiría al medio ambiente con un solo aborto (alrededor de 10^{12} bacterias/mL); en estas condiciones la transmisión al resto de los animales del rebaño se realiza en poco tiempo por contagio directo, ingestión de leche, calostro o vía venérea, por ingestión de material contaminado como pasto, agua, entre otros (Luna y cols., 1992). *B. melitensis* produce infecciones en ovejas y cabras; las principales manifestaciones clínicas son el aborto, orquitis y epididimitis (Nielsen y Duncan, 1990).

La brucelosis humana invariablemente es transmitida de animales infectados al hombre, respecto a la fuente de infección, la Coordinación de Vigilancia Epidemiológica reportó que para los casos ocurridos en los años 1994-1996, la fuente de infección identificada fue leche (24.9%), queso (16.1) y otros (19.1%); y el resto de casos fueron por contacto directo (Velázquez y cols., 1998). En algunos casos la infección se transmite predominantemente por el contacto del hombre con los animales, por lo que se cataloga como una enfermedad profesional de veterinarios, ganaderos, ordeñadores y carniceros



principalmente; sin embargo, en la población abierta la transmisión se debe al consumo de leche, quesos y otros productos lácteos no pasteurizados, vísceras y carne mal cocida proveniente de animales infectados.

Otras formas de infección incluyen contacto directo de excreciones, secreciones o tejidos de animales infectados o fómites contaminados en abrasiones de piel, inhalación de partículas de estiércol contaminado. Inoculación accidental de cepas vacunales y salpicaduras de la bacteria en conjuntiva. Además el personal que maneja cultivos de *Brucella* atenuados o virulentos está en riesgo de adquirir la infección en el laboratorio por ingestión accidental, inhalación de aerosoles infecciosos y contacto de mucosas o piel con *Brucella*. La enfermedad ha sido reconocida como una de las infecciones más comunes transmitidas en laboratorios clínicos, de investigación y producción de vacunas o reactivos de diagnóstico (Mantur y cols., 2007).

3.6. FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRINSECOS IMPORTANTES EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

- Factores dependientes del hospedero: existencia de reservorios, especies sensibles, raza, edad, sexo, estado gestacional, tipo de crianza, extensiva o intensiva e idiosincrasia del propietario.
- Factores dependientes de *Brucella*: virulencia, sensibilidad a agentes físicos y químicos, preferencia de especie y biovares hacia determinada especie animal.
- Factores dependientes del medio ambiente: clima, estacionalidad, instalaciones de los corrales.

La transmisión de *Brucella* y su prevalencia en una región determinada indudablemente dependerá de los factores mencionados y de otros relacionados con los productores, como: hábitos alimenticios, procedimientos para procesar la leche y productos lácteos, costumbres sociales, prácticas de crianza, estatus socioeconómico e higiene ambiental. (López y Contreras, 2010)

3.7. PATOGENIA

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos, y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas. La dosis infectante para el hombre es de 100 UFC (López, 1991).



Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Si no son eliminadas llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportadas, de esta manera, a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares (Pizarro-Cerda y cols., 1998). Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no están suficientemente aclarados aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa (Pontow S, y cols., 1992.) y en un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la afección de *Brucella* por los mismos, además de su intensa replicación dentro de los trofoblastos placentarios. La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes y a la producción de GMP (guanosina 5' monofosfato) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- α . El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso).

3.8. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

Es una enfermedad que se autolimita o se vuelve crónica. Muchos pacientes padecen infecciones asintomáticas. El período de incubación varía entre 10 y 20 días, aunque la sintomatología puede aparecer varios meses después. La variación dependerá de la virulencia de la cepa de *Brucella*, la dosis infectante, la ruta de entrada y el estado nutricional e inmune del individuo. La brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, aguda, recurrente y crónica, según las manifestaciones clínicas. La mayoría de los autores consideran el desarrollo de dos fases en la enfermedad: la aguda y la crónica. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis. Debido al empleo de los antibióticos ya no se registra el clásico patrón de fiebre ondulante. La tercera parte de los pacientes presenta tos seca o productiva, el 30% estreñimiento, el 5-10% diarreas. En el 50% de los casos se produce hepatomegalia ligera o moderada y esplenomegalia y en el 25% adenopatías. Más del 5% de los pacientes



presentan lesiones cutáneas: erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo. Es característico el desarrollo de localizaciones específicas como la osteoarticular, respiratoria, genitourinaria y neuronal. El término brucelosis crónica debe reservarse a pacientes cuya enfermedad lleve un período de evolución mayor de seis meses. Las recaídas o recidivas se presentan en el 15% de los casos, luego de 2 a 3 meses de terminado el tratamiento.

3.9. TRATAMIENTO

Las especies de *Brucella* aisladas en el país son sensibles in vitro a la mayoría de los antibióticos, con excepción de las penicilinas y sus derivados (López y cols., 2004) según la Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994, para la prevención y control de la brucelosis en el hombre el tratamiento de brucelosis debe ser específico y los medicamentos a utilizar serán conforme a los siguientes esquemas:

- Esquema A: tetraciclina y estreptomina, de primera elección para adultos.
- Esquema B: rifampicina y trimetoprim con sulfametoxazol, indicado en niños, mujeres embarazadas (después del primer trimestre) y ancianos.
- Esquema C: doxiciclina y rifampicina, en los casos de que exista fracaso con la administración de los esquemas A o B y en los que la enfermedad presente evolución prolongada.

La evaluación del tratamiento se debe realizar mediante la ausencia de signos y síntomas, ausencia de *Brucella* en sangre, además de disminución o desaparición de los títulos de anticuerpos IgG medidos por la prueba de aglutinación con 2-ME. Actualmente se ha sugerido el empleo de otros antibióticos como diversas quinolonas, tigeciclina, así como el uso de gentamicina en micropartículas (Pappas y cols., 2006)

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, campaña nacional de brucelosis en los animales, cuando existe la sospecha de brucelosis en el hato de los animales deberán ser sometidos a las pruebas diagnósticas autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que son la prueba en tarjeta, prueba de rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche (prueba presuntiva). El estudio bacteriológico se recomienda realizarlo en muestras de leche, sangre y líquidos corporales o fragmentos de tejido. Una vez confirmada la presencia de *Brucella spp.* En cualquier tipo de muestras ratificara que el animal es positivo aun en ausencia de anticuerpos demostrables por métodos serológicos. No existe ningún tratamiento antibiótico recomendado para los animales con brucelosis, por lo que los animales positivos deberán ser sacrificados en un rastro o en una unidad de producción controlada.



3.10. MEDIDAS DE CONTROL

La brucelosis humana tiene su origen en los animales; como consecuencia, la enfermedad dejará de ser un problema para la salud pública cuando se controle y erradique la enfermedad en los reservorios animales. Desde hace décadas se ha contado con vacunas eficaces para el control de la enfermedad; en México, según la NOM-041-ZOO-1995 deben utilizarse vacunas vivas, atenuadas y liofilizadas para prevenir la brucelosis en bovinos, caprinos y ovinos. En el caso de las vacas se utilizan vacunas elaboradas con la cepa 19 de *B. abortus* u otra que autorice la Secretaría, sin embargo no ha sido suficiente contar con buenas vacunas para lograr el control y la erradicación de un padecimiento tan antiguo como este.

Por parte del sector salud se han elaborado normas oficiales que pretenden mejorar los factores de contaminación y la calidad sanitaria de la leche. Entre ellas se pueden mencionar:

- NOM-091-SSA1-95 que establece las especificaciones sanitarias para la leche fluida pasteurizada de vaca.
- NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados, procesados. Especificaciones sanitarias. Esta norma entro en vigor en mayo de 1996 y abarca aspectos microbiológicos y fisicoquímicos; en ella se indica que la elaboración de quesos debe realizarse con leche pasteurizada.

Sin embargo, los productos lácteos de origen artesanal son difíciles de controlar porque se venden en forma clandestina, no tienen etiquetas y la venta se realiza en mercados públicos o en la calle; esto dificulta la aplicación de medidas de control. Los problemas que se presentan con mayor frecuencia en la industria quesera artesanal son: el queso contaminado con microorganismos patógenos de origen o adquiridos durante su elaboración, la falta de tratamiento térmico ya que las técnicas artesanales no incluyen la pasteurización, y la corta vida de los quesos frescos, pues perecen rápido (Meljem y Flores, 1998).

La brucelosis genera grandes pérdidas económicas tanto en la industria pecuaria como en la salud pública, por lo que además de campañas de vacunación en los animales, se debe establecer en incrementar las medidas de prevención, de higiene personal, así como los controles sanitarios en la elaboración y comercialización de leche, quesos y otros derivados lácteos.



3.11. QUESOS

3.11.1. Definición:

De acuerdo a la FAO/OMS el queso es: productos fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos.

3.11.2. Clasificación de acuerdo al tipo de fabricación:

- Fabricación artesanal (tradicional), la cuajada se obtiene añadiendo el cuajo directamente a pequeños volúmenes de leche cruda.
- Fabricación industrial, adopta tratamientos térmicos para pasteurizar la leche. (González, 2002)

3.11.3. EL QUESO COMO RESERVORIO DE *Brucella*

Brucella es una bacteria que posee gran capacidad para sobrevivir y persistir en leche y diferentes derivados lácteos, sobreviven mejor en el queso que en otros productos. El crecimiento de la biota normal de los productos lácteos produce la caída del pH, por el incremento del ácido láctico. Los lactobacilos contribuyen a limitar su crecimiento; sin embargo algunas cepas son capaces de adaptarse al choque ácido y sobreviven. Algunas crecen aun a pH de 4 (Kulakov y cols., 1997); el pH del queso desempeña un papel crítico en la supervivencia y crecimiento de *Brucella*, por lo que es un vehículo potencial de su transmisión a humanos. (Torres Vitela y cols., 2010) (Tabla 2).

TABLA 2

Supervivencia de *Brucella* en leche y diferentes derivados lácteos. Tomado de:*

Cepa o tipo	Medio/ producto	Temperatura	Viabilidad
<i>B. abortus</i>	Leche	25-37 °C	24 horas
<i>B. abortus</i>	Leche	0 °C	18 meses
<i>B. abortus</i>	Crema	4 °C	6 semanas
<i>B. melitensis</i>	Crema	4 °C	4 semanas
<i>B. melitensis</i>	Quesos varios	-	15-100 días
<i>B. melitensis</i>	Queso fresco de cabra	37 °C 4 °C	48-72 horas 11 semanas
<i>B. melitensis</i>	Leche	37 °C 4 °C	5-24 horas 18 meses
<i>B. melitensis</i>	Queso blanco	-	1-8 semanas
<i>B. abortus</i>	Suero de leche	17-24 °C	<4 días
<i>B. melitensis</i>	Mantequilla	8 °C	142 días
<i>B. melitensis</i>	Helado	0 °C	30 días

*(Torres Vitela y cols., 2010)



Las brucelas son bastantes sensibles al calor, así que se destruyen rápidamente a temperaturas de pasteurización, sin embargo, en los quesos frescos artesanales no se lleva a cabo ningún tratamiento térmico lo que provoca la supervivencia y crecimiento de *Brucella* en los mismos (Tabla 3).

TABLA 3. Supervivencia de *Brucella* en diferentes quesos

Supervivencia de <i>Brucella</i> en diferentes quesos		
Tipo de queso	Temperatura	Viabilidad
Queso fresco de leche de vaca	-	1-8 semanas
Queso fresco de leche de vaca	37 °C	48-72 horas
	4 °C	11 semanas
Quesos varios	-	15-100 días

(Torres Vitela y cols., 2010)

3.11.4. METODOS DIAGNOSTICOS DE *Brucella* EN LECHE Y SUS DERIVADOS

3.11.4.1. MICROBIOLÓGICO

Es recomendable el enriquecimiento de los productos lácteos, como los quesos ya que es probable que estas muestras contengan un número pequeño de microorganismos, se necesita que las muestras estén homogenizadas cuidadosamente antes del cultivo, después de haberlas sometido a un triturador de tejidos, a un digestor (“Stomacher”) o a una batidora eléctrica se recomienda centrifugar y cultivar el precipitado, deben aplicarse estrictas medidas de seguridad para evitar aerosoles. El enriquecimiento se puede realizar en medio líquido en caldo de suero-dextrosa, con caldo de triptosa o caldo de (tripticasa)-soja (TSA) o con caldo para *Brucella* suplementado con una mezcla de antibióticos que lleve al menos anfotericina B (1 µg/ml) y vancomicina (20 µg/ml) y deben cultivarse las capas superficiales (corteza y partes adyacentes) y el interior del producto ya que la distribución de *Brucella* por las diferentes partes del producto varía en función de las condiciones físico-químicas locales relacionadas con la tecnología específica del proceso. El medio de enriquecimiento debe incubarse a 37°C con 5–10% de CO₂ hasta 6 semanas, realizando subcultivos semanales a un medio sólido selectivo. Si se prefiere, se puede utilizar un sistema bifásico con un medio selectivo líquido y sólido en el mismo frasco (técnica de Castañeda) para reducir el subcultivo. El cultivo de los derivados lácteos como lo es el queso para la búsqueda de *Brucella* no es tan exitoso ya requiere de mucho tiempo y el porcentaje de recuperación es muy bajo. (Nielsen K., 2012)



3.11.4.2. INMUNOLOGICO

Prueba de anillo en leche

Esta prueba está indicada para la detección de anticuerpos anti *Brucella* en la leche. Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado de *Brucella*, formando con él, un complejo, que se adhiere a los glóbulos de grasa de la leche y que asciende con ellos para formar una capa de crema coloreada, de intensidad variable de acuerdo al grado de reacción. En ausencia de anticuerpos específicos esta capa será blanca y la columna de leche estará colo-reada por las células de *Brucella* teñidas que contiene la suspensión. Esta prueba tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 56% que es una desventaja del método (Bercovich, 1998).

3.11.4.3. DIAGNOSTICO DE DNA DE *Brucella* MEDIANTE PCR

El estándar en el diagnóstico sigue siendo el aislamiento del agente etiológico a partir de tejidos, sangre, exudados, leche, entre otras muestras, con la posterior identificación bacteriológica del aislado. Sin embargo el porcentaje de aislamientos no es tan exitoso en todos los casos (18-70%) y depende de muchos factores. Debido a los inconvenientes que presentan los métodos bacteriológicos, la técnica de PCR ofrece ventajas como una herramienta para el diagnóstico y la identificación de *Brucella*.

El primer reporte de PCR en aislados de *Brucella* fue realizado por Fekete y colaboradores en 1990. Los investigadores diseñaron los oligonucleótidos a partir de la secuencia de una proteína de membrana externa de 43kDa de *B. abortus* S19, con un producto esperado de 635 pares de bases (Fekete y cols., 1990). En 1994 Bricker y Halling diseñaron el primer PCR múltiple a partir de la secuencia de inserción multicopia IS711. Este sistema, nombrado AMOS-PCR, utiliza cinco iniciadores que pueden identificar y diferenciar las especies de *Brucella*; *B. abortus* bv. 1, 2 y 4 amplificaron un producto de 498 pb; *B. melitensis* bv. 1, 2 y 3 amplificaron un producto de 731 pb. (Bricker y Halling, 1994)

3.12. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA. (Pérez de Castro)

Dentro de algunas aplicaciones de la PCR se encuentran el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas humanas, de infecciones virales y bacterianas, en estudios de evolución molecular, clonación y expresión de genes, identificación de individuos, entre otras. Así la técnica de PCR ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades fastidiosas o de crecimiento lento como las del género *Brucella*. Esta técnica podría ser útil como complemento de pruebas serológicas o cuando no hay un resultado concluyente, además de que a diferencia de los cultivos bacteriológicos permite trabajar con microorganismos muertos, hecho que evita el riesgo de infección en el operador (Muller y Faloon, 1987).

Para que el proceso se lleve a cabo en el tubo de reacción debemos encontrar:

1. ADN objetivo (el que se quiere amplificar)

El DNA en el que se encuentre la secuencia que queremos amplificar, suele estar presente en pequeñas cantidades.

2. ADN Polimerasa y deoxinucleótidos (Taq polimerasa)

La ADN polimerasa resistente a altas temperaturas, genera copias complementarias a la secuencia de interés utilizando como materia prima los cuatro nucleótidos que constituyen el ADN: adenina, timina, guanina y citosina.

3. Primers:

También conocidos como “iniciadores” o “cebadores”, son cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos). Cada uno de ellos debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN objetivo. Es importante aclarar que los primers no deben ser complementarios entre sí para evitar la propia replicación (Eduardo Santambrosio) (Figura 4)

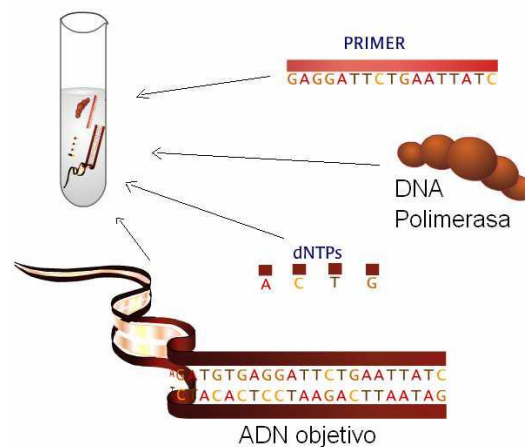


Figura 4. Componentes necesarios en una PCR



3.12.1. ETAPAS DE LA PCR

Desnaturalización: Para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple. Esto se consigue calentando a temperatura de 90 a 95°C para que produzca la rotura de los enlaces puente de hidrogeno intercatenarios y la separación de ambas cadenas, para asegurar la completa separación de la doble cadena del ADN esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de hibridación.

Hibridación: Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar, de tal forma que los oligonucleótidos que flanquean a la secuencia de interés van a poder unirse a sus secuencias complementarias y van a servir de cebadores para que la ADN polimerasa comience a sintetizar nuevas copias. La temperatura a la que se realiza esta etapa debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia (Temperaturas inferiores a la óptima nos producirán hibridaciones inespecíficas de los cebadores y temperaturas superiores nos dificultarán la eficiencia de la misma.

Extensión: Durante esta etapa la ADN polimerasa termoresistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada.

La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la "*Taq polimerasa*" alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN. (IDIBAM, 2008) (Figura 5)

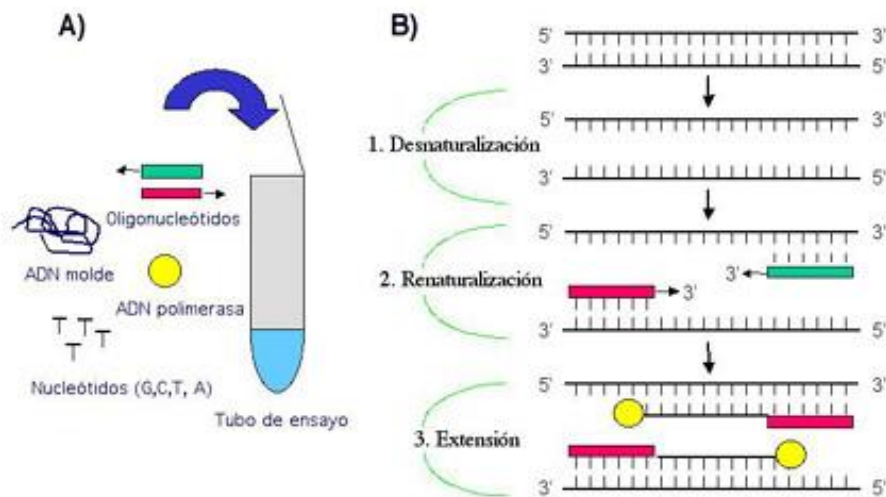


Figura 5. Pasos que constituyen el ciclo de la PCR. A) Principales componentes de la reacción en cadena de la polimerasa. B) Esquema de los tres pasos que constituyen un ciclo de la PCR.

3.13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6- anhidrogalaactosa. La agarosa es muy frágil y las manipulaciones pueden destruirla con facilidad. Los geles de agarosa poseen grandes poros y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa.

Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración.

3.13.1. Tampón de electroforesis

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. En



el peor de los casos, el gel se funde y el ADN se desnaturaliza. Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario. Contienen EDTA (pH 8,0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o trisfosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7,5 – 7,8). Los tampones de electroforesis suelen prepararse en forma de soluciones concentradas y se conservan a temperatura ambiente. El TBE se utilizaba inicialmente a una concentración de trabajo de 1x en el caso de la electroforesis en gel de agarosa. No obstante, una solución de trabajo de 0,5x proporciona un poder más que suficiente y en la actualidad prácticamente todas las electroforesis en gel de agarosa se practican utilizando esta concentración.

3.13.2. Concentración de agarosa

Un fragmento de ADN de un tamaño determinado migra a diferentes velocidades a través de los geles según la concentración de agarosa. En función de la concentración de agarosa o tampón, se pueden separar segmentos de ADN que contengan de 20 a 50 000 pb. En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre un 0,7 % y un 3 %.

3.13.3. ADN marcador

Para una tensión, un gel de agarosa y unas concentraciones de tampón determinadas, la distancia de migración depende del peso molecular del material inicial. Así pues, debe cargarse un ADN marcador de tamaño conocido en las ranuras situadas en los extremos derecho e izquierdo del gel. Generalmente un marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los ADN desconocidos en caso de que se produjese alguna distorsión sistemática del gel durante la electroforesis.



4. MARCO DE REFERENCIA

Se han realizado múltiples reacciones de PCR para la identificación de especies de *Brucella*, desde el método tradicional hasta el que se realizó en este trabajo que es la PCR múltiple.

En 2007 Conde y colaboradores desarrollaron una PCR múltiple que les permitiera detectar e identificar *Brucella sp.* en muestras de leche, donde utilizaron 152 muestras de leche bovina, de tanques de establecimientos libres de brucelosis y 100 de infectados, cada una estaba formada por mezclas de leche de 50 a 300 animales, de las 252 muestras, 4 fueron positivas a PCR múltiple (tres *B. abortus* biot 1 y una *B. suis*).

En 2006 Sullivan y colaboradores realizaron una PCR múltiple con la finalidad de diferenciar a 6 de las 10 especies de *Brucella*, ya que la homología que existe entre las especies es importante, pero también se sabe que existen genes diferentes entre las especies, utilizaron oligonucleótidos específicos para poner de manifiesto estos genes, las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95°C por 35 segundos, alineación de 64°C por 45 segundos y extensión de 72°C durante 3 minutos, este ciclo se repitió 35 veces y finalizó con una etapa de extensión final a 72°C por 6 minutos, reportaron lo siguiente (Tabla 4) respecto a las especies de *B. abortus* y *B. melitensis*:

TABLA 4. PCR múltiple realizado por Sullivan y colaboradores				
Especie de <i>Brucella</i>	Genes que amplifica	Gen ausente	Gen específico	Fragmentos amplificados (pb)
<i>B. melitensis</i>	<i>wboA</i> , <i>omp31</i> , <i>eryC</i> , CRP	<i>rpsL</i>		794, 450
<i>B. melitensis</i> <i>Rev 1</i>	<i>wboA</i> , <i>omp31</i> , <i>eryC</i> , <i>rpsL</i> , CRP		<i>rpsL</i>	794, 450
<i>B. abortus</i>	<i>wboA</i> , <i>eryC</i> , CRP	<i>omp31</i>		794, 450
<i>B. abortus</i> <i>RB51</i>	<i>eryC</i> , CRP	<i>omp31</i> , <i>wboA</i>	2524pb	2524, 794, 450
<i>B. abortus</i> S19	<i>wboA</i> , <i>eryC</i> , CRP	<i>omp31</i>		794, 450



Lo que pone de manifiesto que el gen que diferencia entre las especies de *B. abortus* y *B. melitensis* es el gen *omp31* presente en *B. melitensis* y ausente en *B. abortus*, además de reportar genes específicos de las variantes en la especie. (David J. Sullivan y cols., 2006)

En 2008 López Goñi y colaboradores realizaron una PCR múltiple para diferenciar especies de *Brucella* además de incluir las cepas vacunales encontradas en diferentes laboratorios de Europa, para extraer el DNA ocuparon un kit de lisis de células bacterianas, al realizar la PCR obtuvieron 7 productos de amplificación, siendo de interés para este trabajo *B. abortus* (1682, 794, 587, 450 y 152 pb) y *B. melitensis* (1682, 1071, 794, 587, 450 y 152 pb). (Tabla 5)

TABLA 5. PCR múltiple realizado por López Goñi y colaboradores				
	Especie de <i>Brucella</i>	Tamaño de los amplicones obtenidos (pb)	Tamaño de amplicones deletados (pb)	Tamaño de amplicones adicionales (pb)
Cepas patógenas	<i>B. abortus</i>	1682, 794, 587, 450 y 152		
	<i>B. melitensis</i>	1682, 1071, 794, 587, 450 y 152		
Cepas vacunales	<i>B. abortus</i> S19	1682, 794, 450 y 152	587	
	<i>B. abortus</i> RB51	794, 587, 450 y 152	1682, 1320	2524
	<i>B. melitensis</i> Rev 1			218



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de brucelosis es causa de importantes pérdidas económicas del ganado bovino así como en los productos lácteos que derivan de estos como lo es el queso ya que su presencia representa impedimentos en el comercio y exportación del ganado infectado o proveniente de las zonas endémicas, además de las afecciones humanas; al año se reportan mundialmente más de 500,000 nuevos casos en humanos.

La falta de diagnósticos rápidos y específicos para la identificación de *Brucella* en quesos y en otros alimentos hace del PCR la técnica adecuada para determinar la presencia de esta bacteria en quesos frescos no pasteurizados, los que nos lleva a plantear la siguiente pregunta:

¿Cuál es la prevalencia de *Brucella* en quesos frescos en mercados de la ciudad de Puebla y cuál de sus especies es la más frecuente detectada mediante la técnica de PCR múltiple?



6. JUSTIFICACIÓN

En México la presencia de brucelosis es causa de importantes pérdidas económicas del ganado bovino así como en los productos lácteos que derivan de estos, sin embargo los métodos serológicos y microbiológicos para la identificación de las diferentes especies patógenas en distintos hospederos, así como la diferenciación de cepas vacúnales de estas especies, dificulta la capacidad de distinguir animales infectados de animales vacunados, lo que trae como consecuencia deficiencias en el control de la enfermedad, así como su comercio, promoviendo la permanencia o re-emergencia de esta zoonosis.

Con base en lo anterior, surge la necesidad de implementar un método de PCR múltiple para el diagnóstico molecular rápido y preciso de *Brucella* y sus especies en productos lácteos como los quesos artesanales no pasteurizados, esto con la finalidad de saber cuál es la especie del género *Brucella* que infecta al humano.



7. OBJETIVOS

General

Identificar el DNA de las especies de *Brucella* mediante PCR múltiple a partir de DNA bacteriano obtenido en quesos artesanales no pasteurizados en mercados de la ciudad de Puebla.

Particulares

- 1) Obtener DNA genómico bacteriano para los controles positivos a partir de cepas de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP.
- 2) Seleccionar los oligonucleótidos más adecuados para utilizarlos en la PCR múltiple.
- 3) Hacer un diagnóstico preliminar mediante PCR para amplificar el gen *bp26*.
- 4) Estandarizar y aplicar la PCR múltiple para la detección de *Brucella* en quesos frescos.



8. METODOLOGÍA

8.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR UTILIZANDO CEPAS TIPO

8.1.1 Descongelamiento y aislamiento de cepas de *Brucella* utilizadas como control positivo

Las cepas de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* se obtuvieron en el cepario del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP, se descongelaron lentamente de -70°C manteniéndolas en hielo durante media hora o hasta su completa descongelación. Para su crecimiento fueron sembradas en agar BRUCELLA-BUAP por siembra masiva e incubadas a 37°C , en tensión de CO_2 al 5% durante 48 horas.

8.1.2. Confirmación de cepas del género *Brucella*

8.1.2.1. Extracción de DNA bacteriano de cepas de *Brucella*

Una vez obtenido el crecimiento masivo de *Brucella* se procedió a la extracción de DNA la cual se llevó a cabo con el kit Quick-gDNA MiniPrep. Para ello, se realizó una suspensión del cultivo bacteriano en $200\ \mu\text{L}$ de agua estéril en un tubo para centrifuga, se agito de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente; se transfirió a una columna de extracción contenida en un tubo como soporte y se centrifugó a 11 000 revoluciones durante un minuto, posteriormente se decantó el líquido contenido en el tubo. A la columna se le añadieron $200\ \mu\text{L}$ de buffer de pre-lavado y se centrifugó nuevamente a 11 000 revoluciones por un minuto se decantó y se añadieron $500\ \mu\text{L}$ de buffer de lavado a la columna, se centrifugó y se decantó nuevamente. Posteriormente se transfirió la columna en un tubo para microcentrífuga y se agregaron $500\ \mu\text{L}$ de agua estéril, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugo a 12,000 rpm durante 45 segundos y en el tubo para microcentrífuga se obtuvo el DNA extraído y purificado.

8.1.2.2. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de DNA de cepas control

Los productos de extracción fueron analizados mezclando $5\ \mu\text{L}$ de DNA bacteriano con $2\ \mu\text{L}$ de buffer de DNA y sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el cual se sometió a 90 volts durante 1 hora en buffer TAE IX (0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA pH 8.0). Para estimar la longitud del fragmento de ADN se utilizó el marcador de tamaño molecular de 1000 pb (Gene Ruler™ 1000bp DNA Ladder FERMENTAS). El gel fue teñido en solución de bromuro de etidio a una concentración de $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 5 minutos y posteriormente el material genético se visualizó en el transiluminador UV.



8.1.2.3. Detección del gen *bp26*

Una vez obtenido los DNA de las cepas de *Brucella* utilizadas como control positivo se sometieron a PCR para detectar el gen *bp26* y confirmar que estas cepas fueran del género *Brucella* ya que este gen se encuentra en todas las especies. La técnica de PCR se realizó empleando una mezcla de reacción comercial (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA) a la cual se le adicionaron los oligonucleótidos y el ADN extraído de las cepas, lo que se muestra en la (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción a emplear en la técnica de PCR

Mezcla de reacción a emplear en la técnica de PCR	
GoTaq (Master Mix)	12.5µL
Iniciadores	1µL de c/u (2µL)
ADN obtenido de cepas	5µL
Agua inyectable	5.5 µL
Volumen final	25µL

La mezcla de reacción final se sometió a un proceso de amplificación en un termociclador (Mastercycler Personal, EPPENDORF). El programa consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95°C por 35 segundos, alineación de 64°C por 45 segundos y extensión de 72°C durante 3 minutos, este ciclo se repitió 35 veces y finalizó con una etapa de extensión final a 72°C por 6 minutos (García y cols., 2006). Posteriormente se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa descrita anteriormente, se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5µg/mL durante 5 minutos y el material genético se visualizó en el transiluminador UV.

8.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE UTILIZANDO LAS CEPAS TIPO.

8.2.1. Confirmación de especies de *Brucella*

La identidad de las cepas de referencia *B. abortus* y *B. melitensis* fue confirmada mediante PCR múltiple empleando una mezcla de reacción comercial (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA), a la cual se le añadieron los oligonucleótidos iniciadores para la identificación de los genes: *wboA*, *omp 31*, *ery C*, *rpsL* y regulador transcripcional (*crp*) (Tabla 7) y el DNA extraído, en la Tabla 8 se señalan las cantidades usadas en el PCR múltiple para la confirmación de las especies de *Brucella* utilizadas como control.


 TABLA 7. Iniciadores empleados para la identificación de especies de *Brucella* y tamaño de los productos de amplificación.

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Gen Blanco	Tamaño del Amplicón (pb)
WbF	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	wboA	1,682
WbR	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC		
OmpF	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	omp31	1,071
OmpR	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG		
ErF	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	eryC	587
ErR	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG		
RPS F	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	rpsL	218
RPS R	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA		
CRP F	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	Regulador transcripcional (<i>crp</i>)	152
CRP R	GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT		

 Tomado de García *et al.*, 2006

 TABLA 8. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR múltiple para la confirmación de especies de *Brucella*.

GoTaq (Master Mix)	12.5µL
Iniciadores	0.5µL de c/u (5µL)
ADN genómico	5µL A una concentración de 127ng/µL para <i>B. abortus</i> y 59.9 ng/µL para <i>B. melitensis</i> .
Agua estéril	2.5 µL
Volumen final	25µL

La mezcla de reacción final se sometió a un proceso de amplificación en un termociclador (Mastercycler Personal, EPPENDORF). El programa consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95°C por 35 segundos, alineación de 64°C por 45 segundos y extensión de 72°C durante 3 minutos, este ciclo se repitió 25 veces



y finalizó con una etapa de extensión final a 72°C por 6 minutos (García y cols., 2006). Posteriormente se sometió a una electroforesis en gel de agarosa descrita anteriormente, se realizó una tinción en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5µg/mL durante 5 minutos y posteriormente el material genético se visualizó en el transiluminador UV. Una vez obtenidos los amplicones de cada una de las cepas de *Brucella*, se diseñó la PCR múltiple para detectar las especies de *Brucella* en los quesos positivos al gen *bp26*.

8.2.2. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA EXTRAÍDO DE LAS CEPAS CONTROL

Una vez confirmadas las especies de *Brucella*, se determinó la concentración y pureza del DNA de *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 mediante una cuantificación de DNA realizada en un nanofotómetro marca Implen a absorbancias de 230, 260, 280 y 320 nm. Se realizaron diluciones del DNA de las cepas de *Brucella* empleadas como control positivo a 1:2, 1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000 en agua estéril y se hizo una PCR múltiple con estas diluciones con la finalidad de saber que concentración de DNA es la mínima a emplear en una reacción de PCR y obtener los amplicones adecuados para cada especie de *Brucella*.

8.2.3. INOCULACIÓN DE QUESOS DE LECHE DE CABRA Y VACA CON *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*.

Para verificar el método se inocularon quesos frescos hechos de leche de vaca y cabra con *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16, se hizo una suspensión bacteriana por igualación de turbidez a una concentración de 3×10^8 partículas y posteriores diluciones hasta llegar a 60,000 partículas para inocular 50mL, ya que la concentración de bacterias reportada para la detección de *Brucella* mediante PCR es de 1000 UFC/mL de leche en el ganado bovino cuando tiene brucelosis (M. E. R. Hamdy, A. S. Amin, 2001) , ésta suspensión se inoculó en la homogenización realizada con los quesos y caldo BRUCELLA-BUAP en relación 1:10 (10g de queso en 90 mL de caldo) y triturada en una licuadora a velocidad máxima durante un minuto, posteriormente se incubó por 3 horas a 37°C y se tomó una alícuota de 50 mL la cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó en un tubo cónico estéril y el sobrenadante se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se trabajó la extracción con el pellet obtenido y el kit Quick-gDNA MiniPrep utilizando la misma metodología descrita para la extracción de DNA de cepas, así como también se utilizó la misma metodología para la visualización de DNA y PCR múltiple.

8.3. PROCESAMIENTO DE LOS QUESOS

8.3.1. Selección de mercados muestreados

Los quesos frescos de leche de vaca fueron obtenidos de diferentes mercados de la ciudad de Puebla (Tabla 9 y Figura 7), y elaborados en diferentes partes del estado o diferentes estados (Tabla 10 y Figura 8), se muestrearon 15 de 29 mercados oficiales de la ciudad de Puebla (Figura 6), de los cuales los criterios de exclusión para su muestreo fueron:

1. Estar fuera de funcionamiento
2. No contar con locales donde se vendiera queso fresco de leche de vaca
3. No saber la procedencia de los quesos vendidos
4. Que los quesos fueran pasteurizados

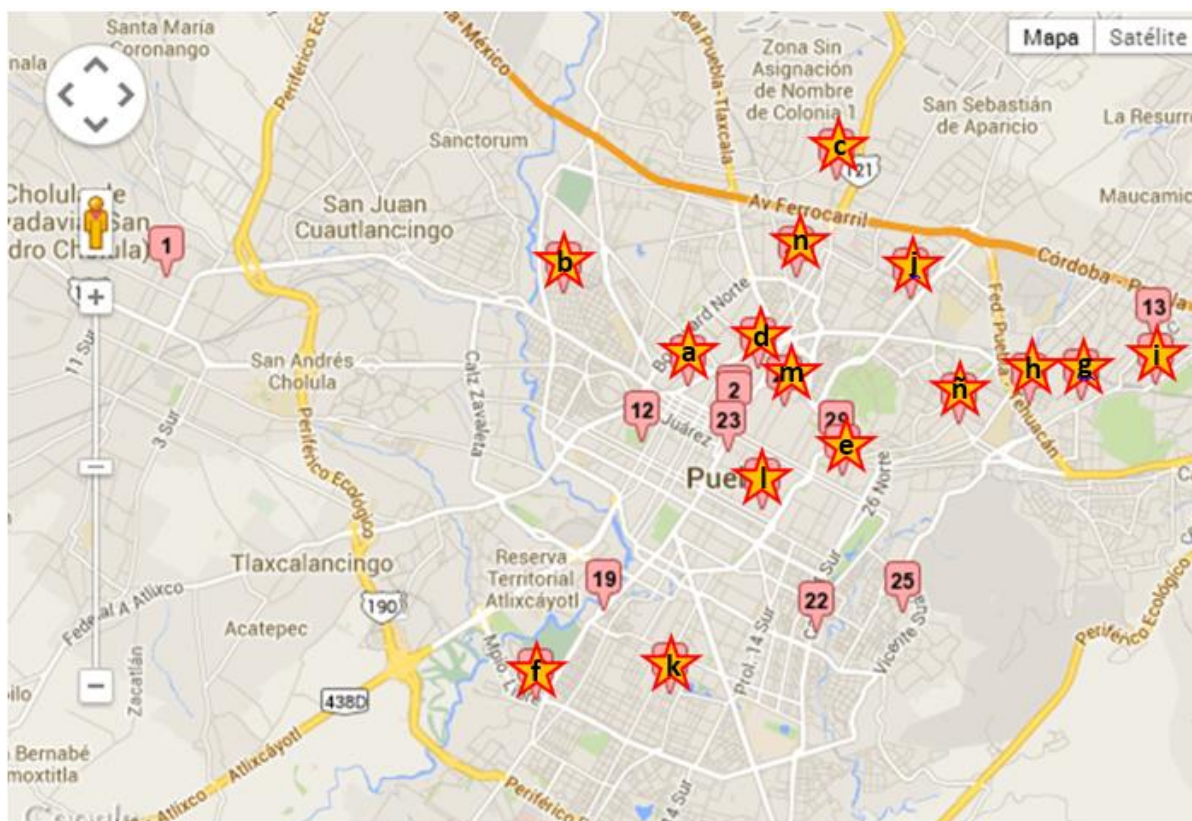


Figura 6. Mapa de la ciudad de Puebla en donde se muestran los mercados oficiales y se señalan con una estrella de color amarillo los mercados muestreados en este proyecto.



TABLA 9. NUMERO DE MUESTRAS POR MERCADO

<i>Mercado</i>	Número de muestras por mercado
<i>a</i>	3
<i>b</i>	2
<i>c</i>	5
<i>d</i>	3
<i>e</i>	4
<i>f</i>	2
<i>g</i>	3
<i>h</i>	1
<i>i</i>	4
<i>j</i>	2
<i>k</i>	4
<i>l</i>	1
<i>m</i>	5
<i>n</i>	6
<i>ñ</i>	5
TOTAL	50

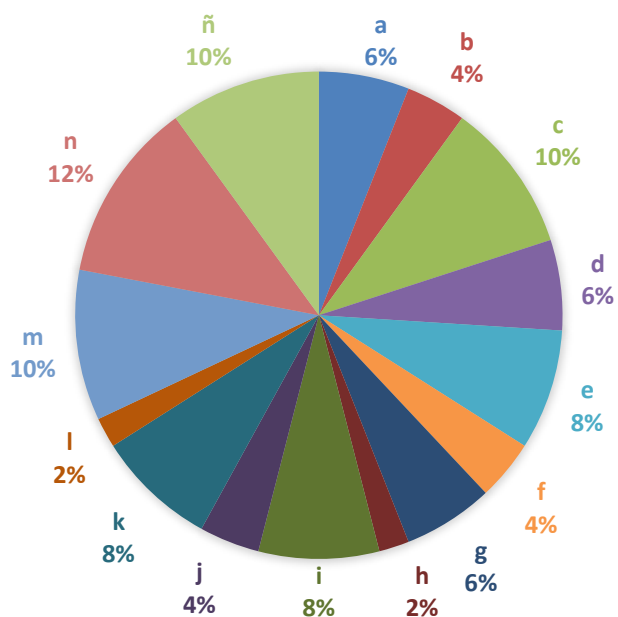


Figura 7. Porcentaje de quesos analizados por mercados.



Tabla 10. Procedencia de los quesos muestreados en la ciudad de Puebla

<i>Procedencia de los quesos</i>	Número de muestras por procedencia	Mercado donde se recuperó la muestra
<i>Atlixco, Puebla</i>	2	c, k
<i>Chignahuapan, Puebla</i>	1	d
<i>Chipilo, Puebla</i>	9	a, b, d, g, g, h, i, m ñ,
<i>Cuidad de Puebla</i>	1	ñ
<i>Jalapa, Veracruz</i>	1	j
<i>Las Vigas, Tlaxcala</i>	1	m
<i>San Antonio Cacalotepec, Puebla</i>	1	m
<i>San Gregorio Zacapechpan, Puebla</i>	1	a
<i>San Martín Texmelucan, Puebla</i>	3	i, k, m
<i>San Rafael, Veracruz</i>	1	n
<i>Santa Ana Chautempan, Tlaxcala</i>	1	n
<i>Santa Ana Xamimilulco, Puebla</i>	2	e, f
<i>Santa Catarina, Puebla</i>	1	c
<i>Santa Clara, Puebla</i>	1	n
<i>Santa Cruz Aquiahuatl, Puebla</i>	6	c, e, f, i, i, m
<i>Santa Elena Axocopa, Puebla</i>	1	c
<i>Santa Isabel Tlatlahua, Tlaxcala</i>	1	e
<i>Santa María Tonanzintla, Puebla</i>	7	a, b, c, j, k, n, ñ
<i>Santiago Xalizintla, Puebla</i>	1	d
<i>Tecamachalco, Puebla</i>	2	g, n
<i>Tlaxcala</i>	4	e, l, ñ, ñ
<i>Tlaxcalancingo, Puebla</i>	2	k, n
TOTAL	50	

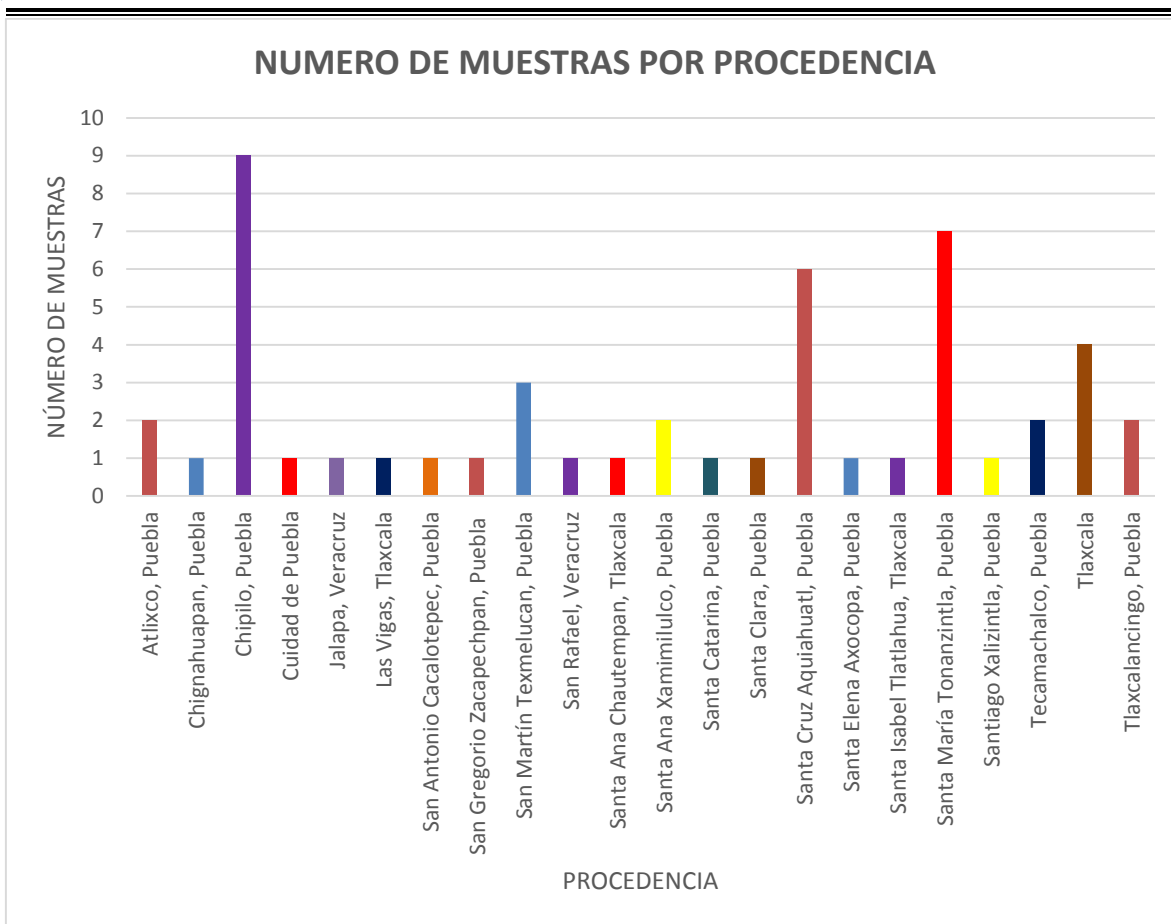


Figura 8. Grafica que muestra el número de quesos por procedencia.

8.3.2. Extracción de DNA bacteriano de quesos

La extracción de DNA bacteriano a partir de quesos frescos se llevó a cabo haciendo una suspensión de queso en caldo Brucella-BUAP en relación 1:10 (10g de queso en 90mL de caldo), posteriormente se incubó por 3 horas a 37°C y se tomó una alícuota de 50mL la cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó en un tubo cónico estéril y este sobrenadante se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos, y se desechó el sobrenadante, se trabajó la extracción con el pellet obtenido y el kit Quick-gDNA MiniPrep utilizando la misma metodología descrita para la extracción de DNA de cepas, así como también se utilizó la misma metodología para la visualización de DNA.



8.3.3. Selección tamiz de DNA de muestras de quesos por PCR para detectar el gen *bp26*

Una vez obtenido el DNA bacteriano de los quesos se sometieron a PCR para detectar el gen *bp26* y poner de manifiesto la presencia de *Brucella*. La técnica de PCR se realizó empleando una mezcla de reacción comercial (GoTaq® Green Master Mix, PROMEGA) a la cual se le adicionaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *bp26* y el ADN extraído de los quesos lo que se muestra en la Tabla 11

TABLA 11. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR para la detección del gen *bp26* en DNA extraído de quesos de leche de vaca.

GoTaq (Master Mix)	12.5µL
Oligosacáridos Iniciadores	1µL de c/u (2µL)
ADN genómico	5µL
Agua estéril	5.5 µL
Volumen final	25µL

La mezcla de reacción final se sometió a un proceso de amplificación en un termociclador (Mastercycler Personal, EPPENDORF). El programa consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95°C por 35 segundos, alineación de 64°C por 45 segundos y extensión de 72°C durante 3 minutos, este ciclo se repitió 35 veces y finalizó con una etapa de extensión final a 72°C por 6 minutos (García y cols., 2006). Posteriormente se sometió a una electroforesis en gel de agarosa descrita anteriormente, se realizó una tinción en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5µg/mL durante 5 minutos y el material genético se visualizó en el transiluminador UV.

9. RESULTADOS

9.1. Estandarización de la PCR múltiple utilizando cepas tipo

9.1.1. Descongelamiento y aislamiento de cepas de *Brucella*

Se obtuvo un crecimiento adecuado a las 48 horas de incubación en tensión de CO₂ a 37°C, colonias redondas de 1-2mm de diámetro, con bordes lisos, translúcidas y de color ámbar. (Figuras 9 y 10)



FIGURA 9. Crecimiento de *Brucella abortus* S19 a las 48 horas en agar BRUCELLA-BUAP.

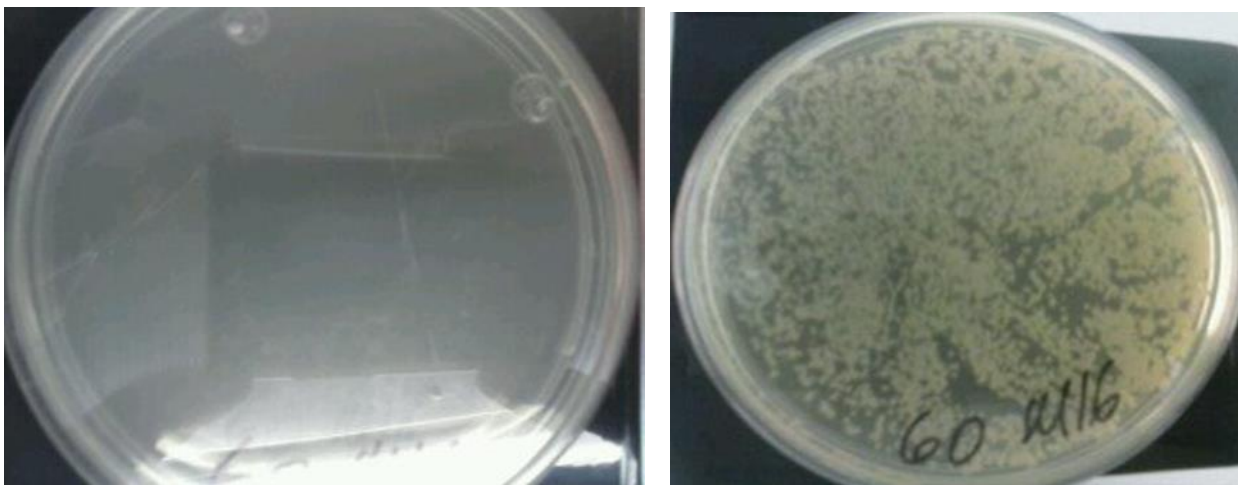


FIGURA 10.

Crecimiento de *Brucella melitensis* M16 a las 48 y 72 horas en agar BRUCELLA-BUAP.

9.1.2. EXTRACCIÓN DE DNA DE CEPAS DE *Brucella*

La extracción de DNA de las cepas control se realizó a partir de colonias con 48 horas de incubación y sembradas en agar BRUCELLA-BUAP, todo el material utilizado fue nuevo y estéril, la extracción se realizó con el kit Quick-gDNA MiniPrep y con la metodología descrita el desarrollo experimental.

VISUALIZACIÓN DE DNA DE CEPAS de *Brucella*

Los productos de extracción fueron analizados para confirmar la existencia de DNA en la muestra. (Figura 11)

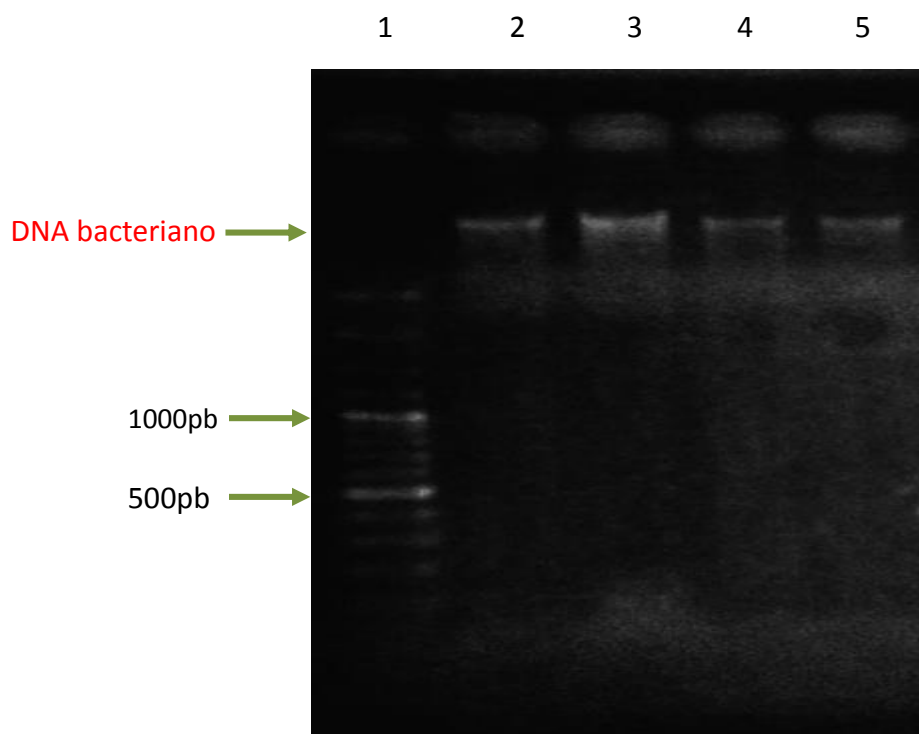


Figura 11. DNA de especies de *Brucella* utilizadas como control positivo. L1, marcador de tamaño molecular; L2, DNA extraído y purificado de *Brucella abortus* RB51; L3, DNA extraído y purificado de *Brucella abortus* S19; L4, DNA extraído y purificado de *Brucella melitensis* H8; L5, DNA extraído y purificado de *Brucella melitensis* M16.

9.1.3. Confirmación de especies de *Brucella*

Una vez obtenido el DNA genómico bacteriano se realizó una PCR simple (Figura 12) para detectar al gen *bp26* y una PCR múltiple para confirmar la especie de *Brucella* a utilizar como control positivo utilizando oligonucleótidos para poner de manifiesto a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC*, *rpsL* y *crp* de 1682, 1071, 587, 218 y 152 pb respectivamente y así elegir a la biovariedad adecuada de cada especie de *Brucella* para utilizarla en el PCR múltiple, cabe destacar que las dos especies de *Brucella* analizadas son patógenas para el ganado bovino y también para el humano al consumir sus productos lácteos como el queso fresco (Figura 13)

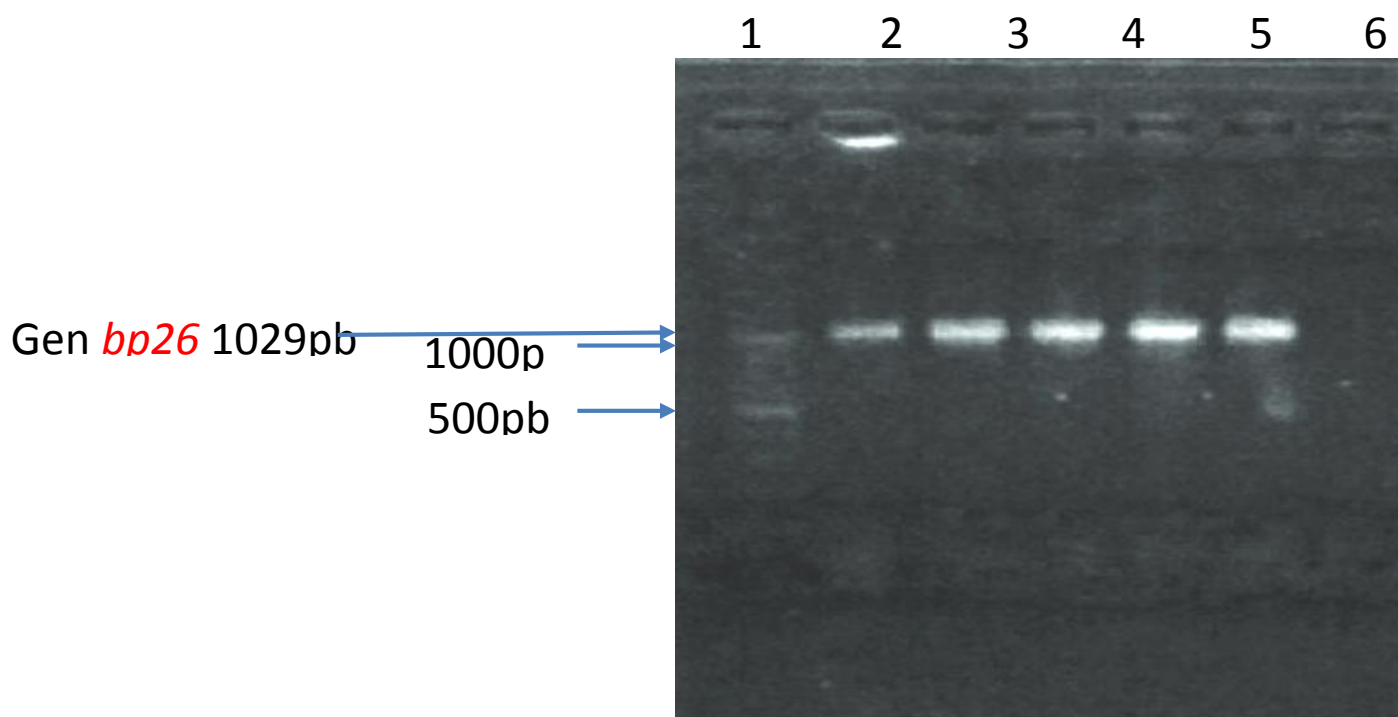


Figura 12. Identificación del gen *bp26* en DNA de las cepas control *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, control positivo *Brucella* donde se observa el amplicón de 1029pb correspondiente al gen *bp26*; L2, *Brucella melitensis* M16 donde se observa el amplicón correspondiente al gen *bp26* con 1029pb; L3, *Brucella melitensis* H8 donde se observa el amplicón correspondiente al gen *bp26* con 1029pb; L4, *Brucella abortus* donde se observa el amplicón correspondiente al gen *bp26* con 1029pb; L5, *Brucella abortus* donde se observa el amplicón correspondiente al gen *bp26* con 1029pb; L6, control negativo.

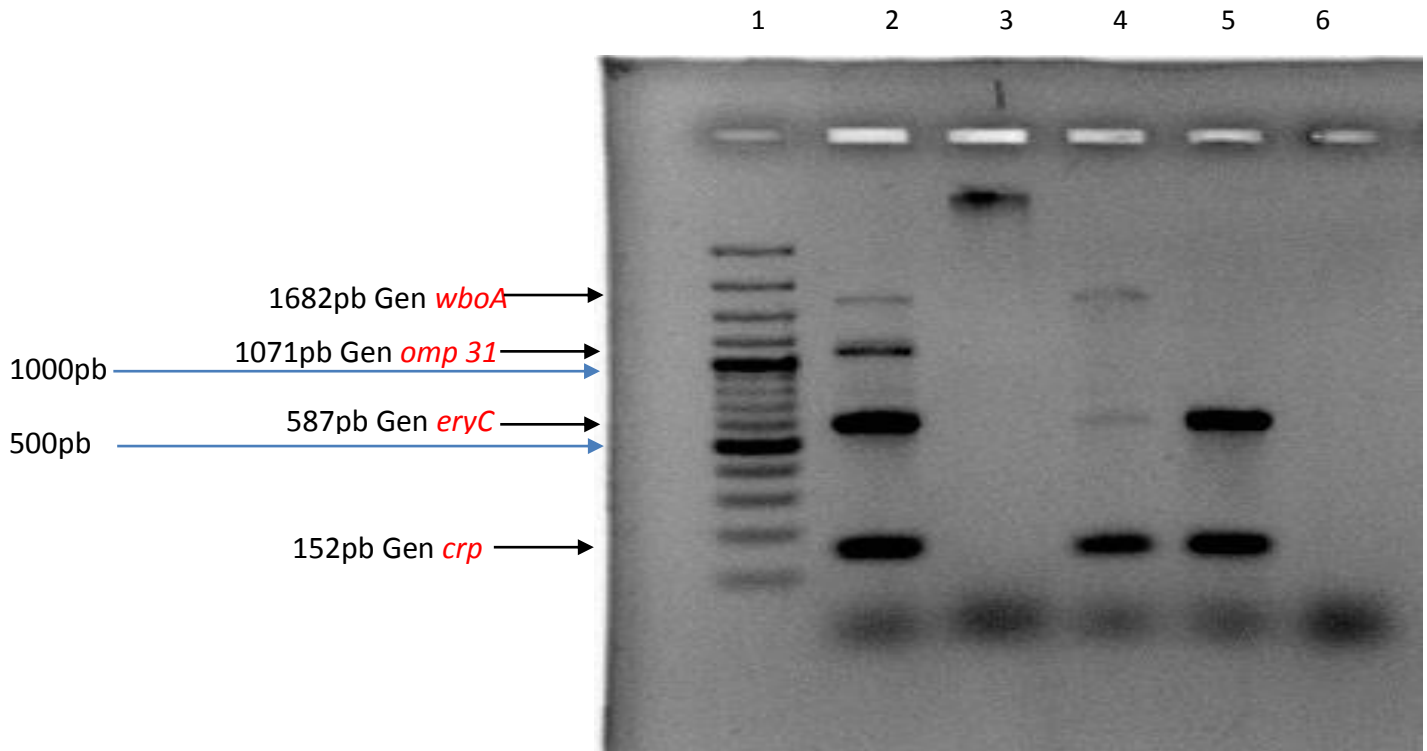


Figura 13. Diferenciación de cepas de *Brucella* relacionadas con infección en el ganado bovino por PCR múltiple. L1, marcador de tamaño molecular; L2, *Brucella melitensis* M16 donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y CRP con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L3, *Brucella melitensis* H8 donde se observa DNA sin amplificación de genes; L4, *Brucella abortus* S19 donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y CRP con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L5, *Brucella abortus* RB51 donde se observan amplicones correspondientes a los genes *eryC* y CRP con 587 y 152 pb respectivamente; L6, control negativo.

Se hizo la elección de las especies *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 como controles positivos en la PCR múltiple por ser las cepas tipo.

9.1.4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA EXTRAÍDO DE LAS CEPAS CONTROL

Una vez seleccionadas las biovars de las especies de *Brucella* que se utilizaron como controles positivos *Brucella abortus* S19 y *Brucella melitensis* M16 se determinó la concentración y pureza del DNA mediante una cuantificación de DNA realizada en un nanofotómetro marca Implen a absorbancias de 230, 260, 280 y 320nm obteniendo para *Brucella abortus* S19 una concentración de 127ng/μL y una pureza de 1.801, sabiendo que la pureza de DNA extraído por medio de kits comerciales es máximo de 2, y para *Brucella melitensis* M16 una concentración de 59.9ng/μL y una pureza de 1.714 (Figura 14).

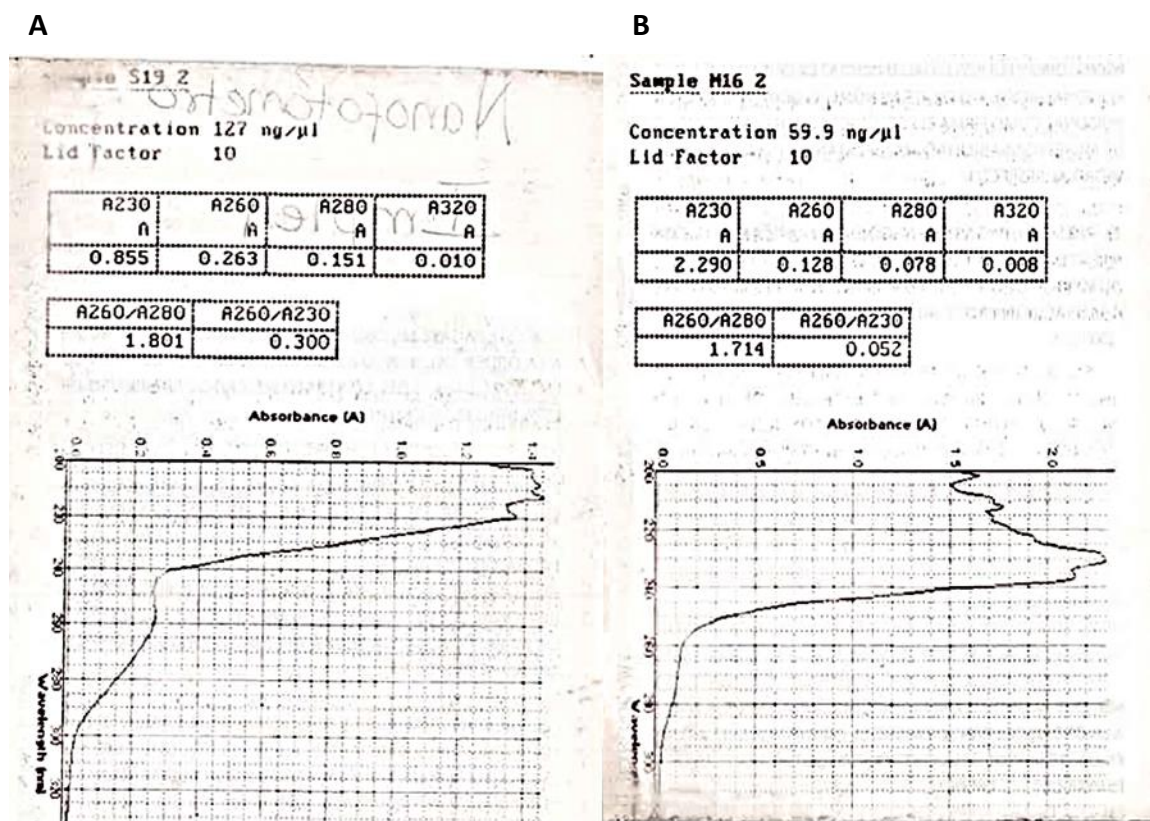


Figura.14 Concentración y pureza de DNA extraído de cepas de *Brucella* utilizadas como control. A) *Brucella abortus* B) *Brucella melitensis*.



Se realizó una dilución del DNA de *Brucella abortus* S19 para aproximar las concentraciones entre las dos especies, la dilución se realizó de acuerdo a la siguiente formula:

$$(C_1) (V_1) = (C_2) (V_2)$$

$$(127\text{ng}/\mu\text{L}) (X) = (60\text{ ng}/\mu\text{L}) (10\mu\text{L})$$

$$X = \frac{(60\text{ ng}/\mu\text{L}) (10\mu\text{L})}{(127\text{ng}/\mu\text{L})}$$

$$X = 4.72\mu\text{L}$$

Se obtuvo una concentración de 60 ng/ μL de DNA de la especie de *Brucella abortus* S19. Se realizaron PCR múltiple para las diluciones del DNA de las cepas de *Brucella* empleadas como control positivo obteniendo lo siguiente: (Tabla 12) (Figuras 15 y 16)

Tabla 12. Genes amplificados a las diferentes concentraciones de DNA bacteriano de las cepas utilizadas como control positivo								
Genes	Dilución de <i>Brucella abortus</i> S19				Dilución de <i>Brucella meliensis</i> M16			
	1:5 (12 ng/μL)	1:10 (6 ng/μL)	1:100 (0.6 ng/μL)	1:1000 (0.06 ng/μL)	1:5 (11.98 ng/μL)	1:10 (5.99 ng/μL)	1:100 (0.599 ng/μL)	1:1000 (0.059 ng/μL)
<i>wboA</i> (1682 pb)	✓	✓			✓	✓		
<i>omp 31</i> (1071 pb)					✓	✓		
<i>ery C</i> (587 pb)	✓	✓			✓	✓	✓	✓
<i>rpsL</i> (218 pb)								
CPR (152 pb)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

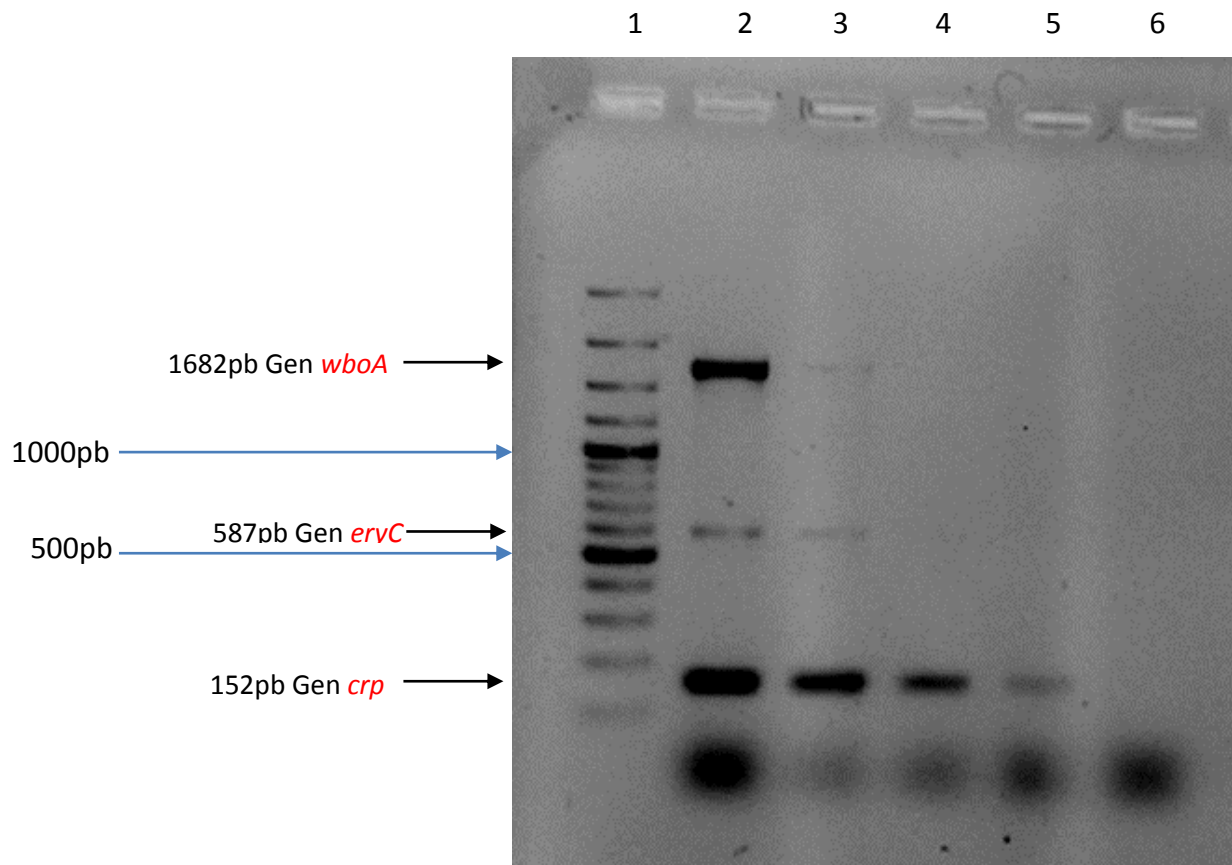


Figura 15. PCR múltiple de diferentes concentraciones de DNA de *B. abortus*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, DNA de *B. abortus* a concentración de 30 ng/μL donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y *crp* con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L3, DNA de *B. abortus* a concentración de 12ng/μL donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y *crp* con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L4, DNA de *B. abortus* a concentración de 6ng/μL donde se observa el amplicón correspondiente al gen *crp* con 152 pb; L5, DNA de *B. abortus* a concentración de 0.6ng/μL donde se observa el amplicón correspondiente al gen *crp* con 152 pb; L6, DNA de *B. abortus* a concentración de 0.06ng/μL donde no se observa ningún amplicón.

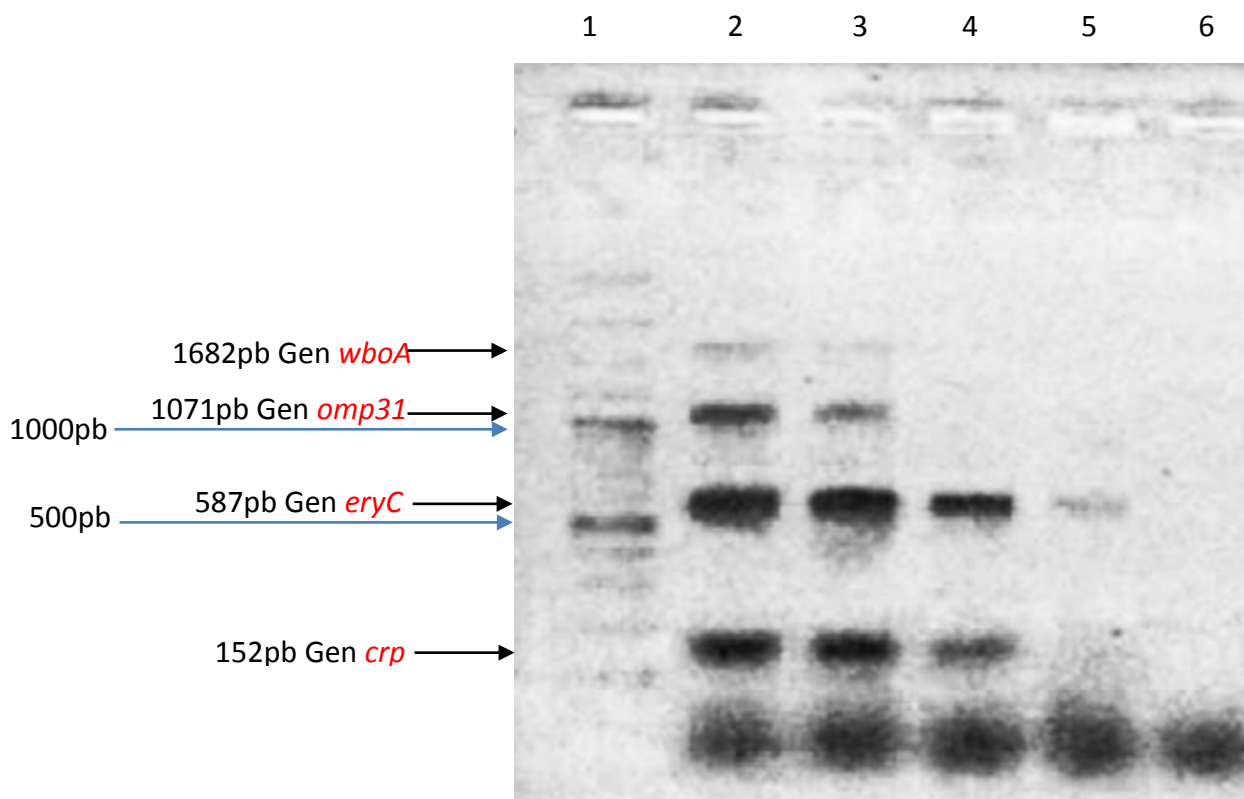


Figura 16. PCR múltiple de diferentes concentraciones de DNA de *B. melitensis*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, DNA de *B. melitensis* a concentración de 29.95 ng/μL donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y *crp* con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L3, DNA de *B. melitensis* a concentración de 11.98ng/μL donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y *crp* con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L4, DNA de *B. melitensis* a concentración de 5.99ng/μL donde se observan amplicones correspondientes a los genes *eryC* y *crp* con 587 y 152 pb respectivamente; L5, DNA de *B. melitensis* a concentración de 0.599ng/μL donde se observa el amplicón correspondiente al gen *eryC* con 587 pb; L6, DNA de *B. melitensis* a concentración de 0.0599ng/μL donde no se observan amplicones.

9.1.5. INOCULACIÓN DE QUESOS DE LECHE DE CABRA Y VACA CON *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*.

Se verificó la presencia de DNA bacteriano mediante una electroforesis en gel de agarosa con la metodología descrita anteriormente, observando en la Figura 17 la presencia de DNA bacteriano en los quesos de leche de vaca inoculados, no así en los quesos de leche de cabra.

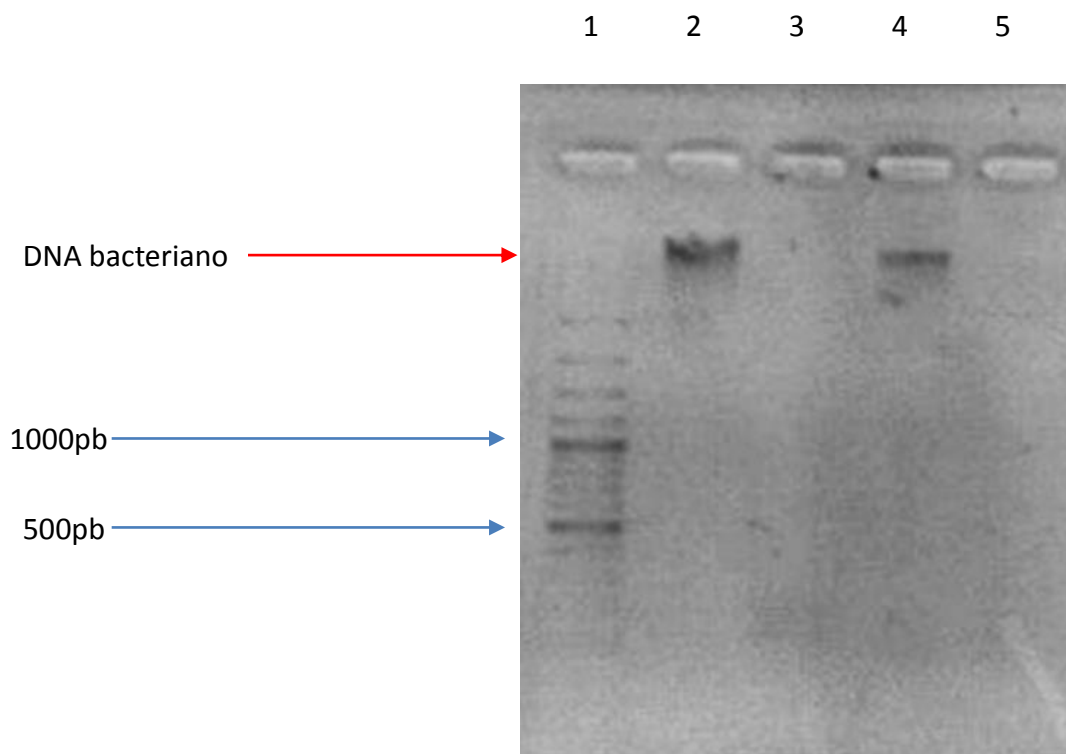


Figura 17. DNA de quesos inoculados con *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, DNA obtenido de queso de vaca inoculado con *Brucella abortus* S19; L3, DNA obtenido de queso de cabra inoculado con *Brucella abortus* S19; L4, DNA obtenido de queso de vaca inoculado con *Brucella melitensis* M16; L5, DNA obtenido de queso de cabra inoculado con *Brucella melitensis* M16.

El DNA bacteriano obtenido del queso de cabra fue concentrado de 50 μ L a 25 μ L en un concentrador de DNA, en condiciones rotación, vacío y a temperatura ambiente, se le realizó una electroforesis con la misma metodología para su mejor visualización, comprobando la presencia de DNA bacteriano observado en la Figura 18.

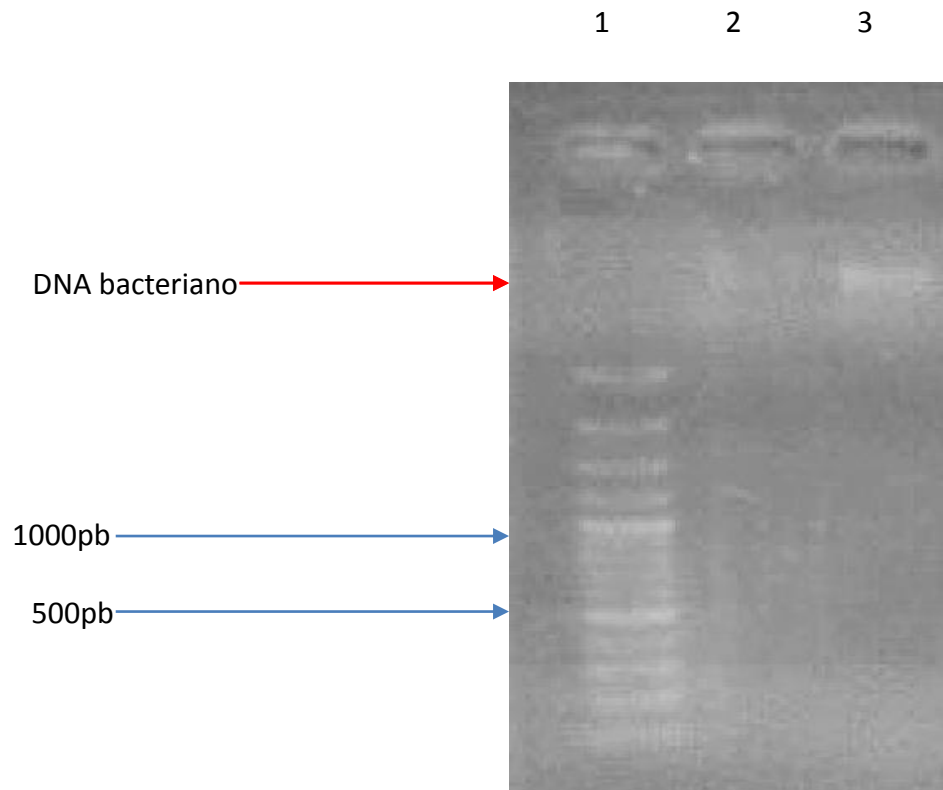


Figura 18. DNA concentrado de los quesos inoculados. L1, Marcador de peso molecular; L2, DNA obtenido de queso de cabra inoculado con *Brucella abortus* S19; L3, DNA obtenido de queso de cabra inoculado con *Brucella melitensis* M16.

Una vez obtenidos los DNA bacteriano de los quesos inoculados se realizó una PCR para la identificación del gen bp26 obteniendo positivos a este gen las 4 muestras procesadas (Figura 19)

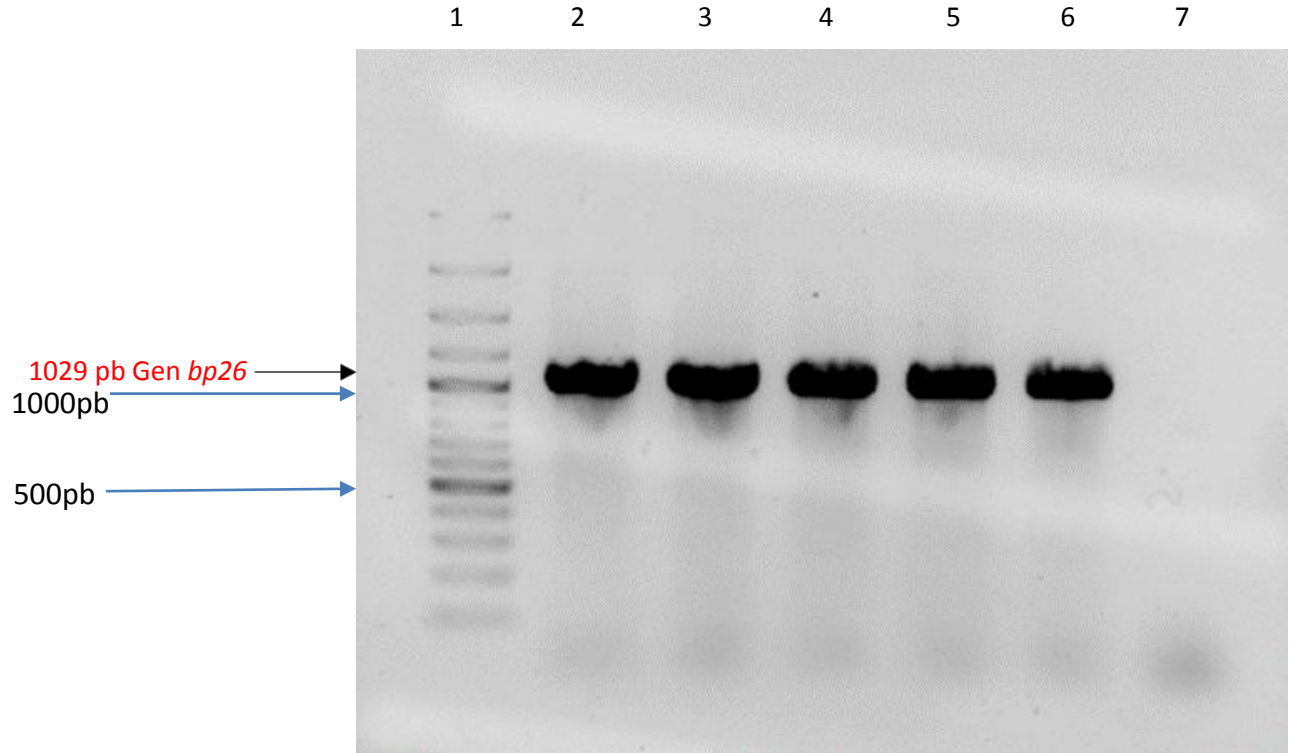


Figura 19. Identificación del gen *bp26* en quesos de cabra y vaca inoculados con *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, control positivo *Brucella* donde se observa el amplicón de 1029pb correspondiente al gen *bp26*; L3-L6, quesos de cabra y vaca inoculados con *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* en donde se observa el amplicón de 1029pb correspondiente al gen *bp26*; L7, control negativo.

Posteriormente se realizó una PCR múltiple para verificar las especies de *Brucella* inoculadas en los diferentes quesos, obteniendo los amplicones esperados en las 4 muestras trabajadas (Figura 20), con lo que se demuestra que la PCR es una técnica muy específica y sensible a pesar de que la concentración de *Brucella* en el queso sea muy baja.

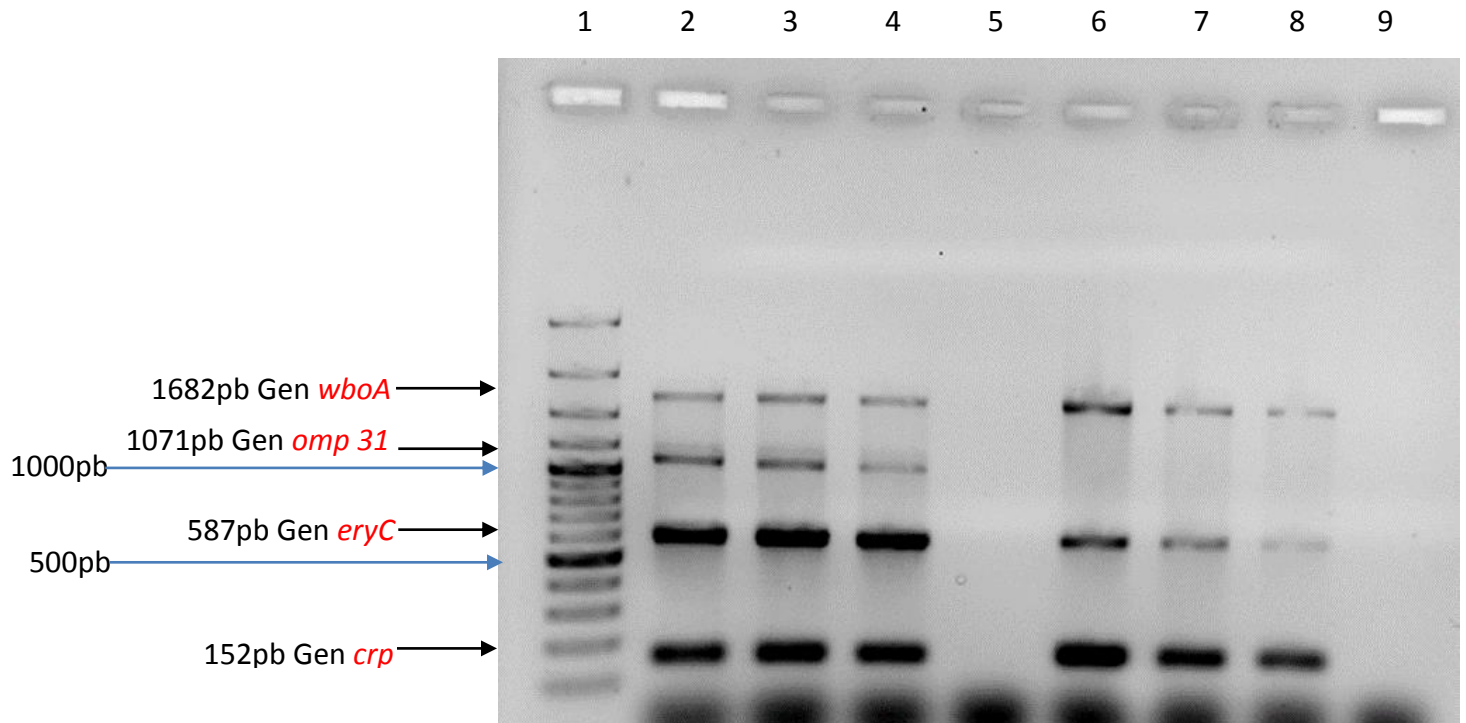


Figura 20. PCR múltiple de DNA de quesos de cabra y vaca inoculados con *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. L1, marcador de tamaño molecular; L2, control positivo *Brucella melitensis* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y CRP con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L3, queso de vaca inoculado con *B. melitensis* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y CRP con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L4, queso de cabra inoculado con *B. melitensis* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *omp31*, *eryC* y CRP con 1682, 1071, 587 y 152 pb respectivamente; L5, control negativo; L6, control positivo *B. abortus* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y CRP con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L7, queso vaca de inoculado con *B. abortus* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y CRP con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L8, queso de cabra inoculado con *B. abortus* donde se observan amplicones correspondientes a los genes *wboA*, *eryC* y CRP con 1682, 587 y 152 pb respectivamente; L9, control negativo.

9.2. PROCESAMIENTO DE LOS QUESOS

Una vez demostrada la sensibilidad de la PCR para identificación de *Brucella* en quesos frescos de leche de cabra y vaca se procedió a trabajar con los quesos frescos obtenidos de mercados de la ciudad de Puebla, la extracción de DNA bacteriano de dichos quesos se llevó a cabo con la metodología descrita en el desarrollo experimental (Figura 21)

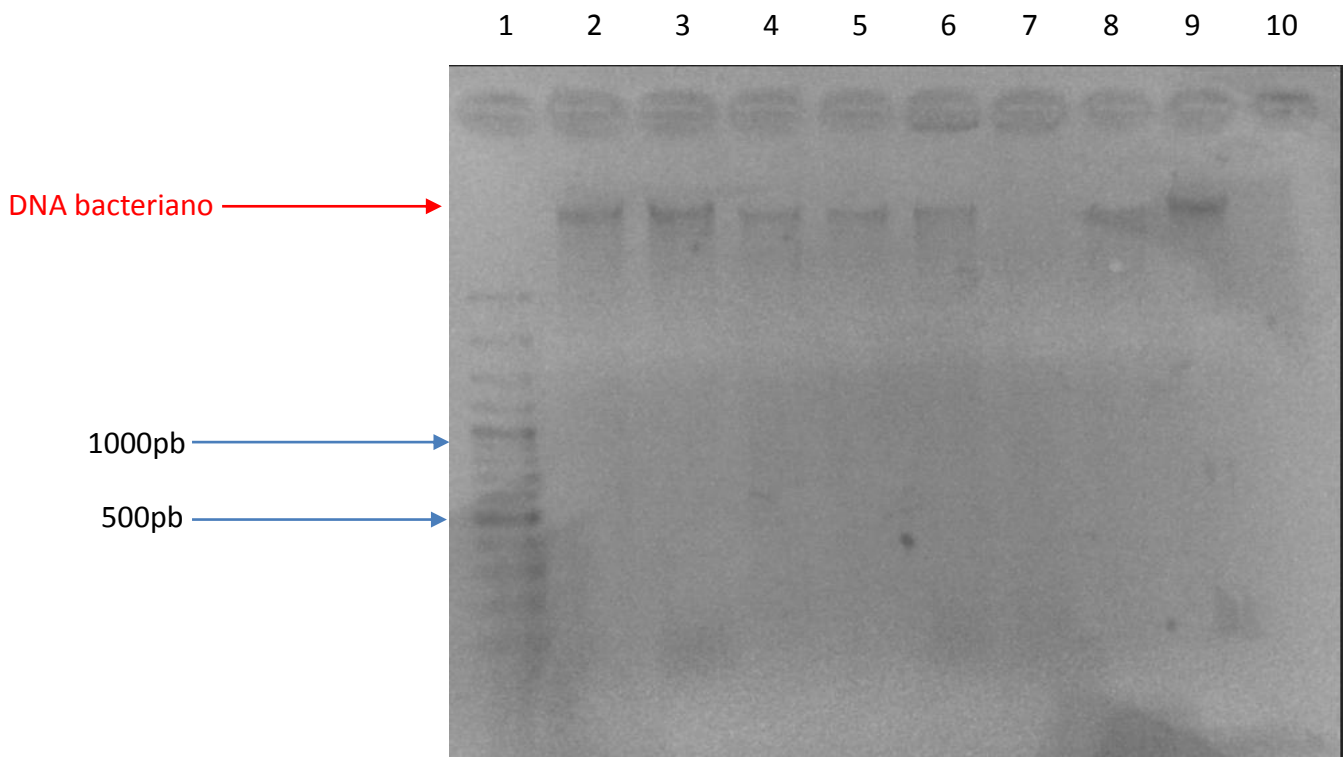


Figura 21. DNA de quesos frescos de leche de vaca. L1, marcador de tamaño molecular; L2-L9, DNA de quesos frescos de leche de vaca.

Una vez obtenido el DNA de las 50 muestras de queso se procedió a hacer una selección mediante PCR para detectar al gen *bp26* que se encuentra en todas las biovars de las especies de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, se utilizó la misma metodología descrita anteriormente, resultando las 50 muestras negativas al gen *bp26*. (Figura 22)

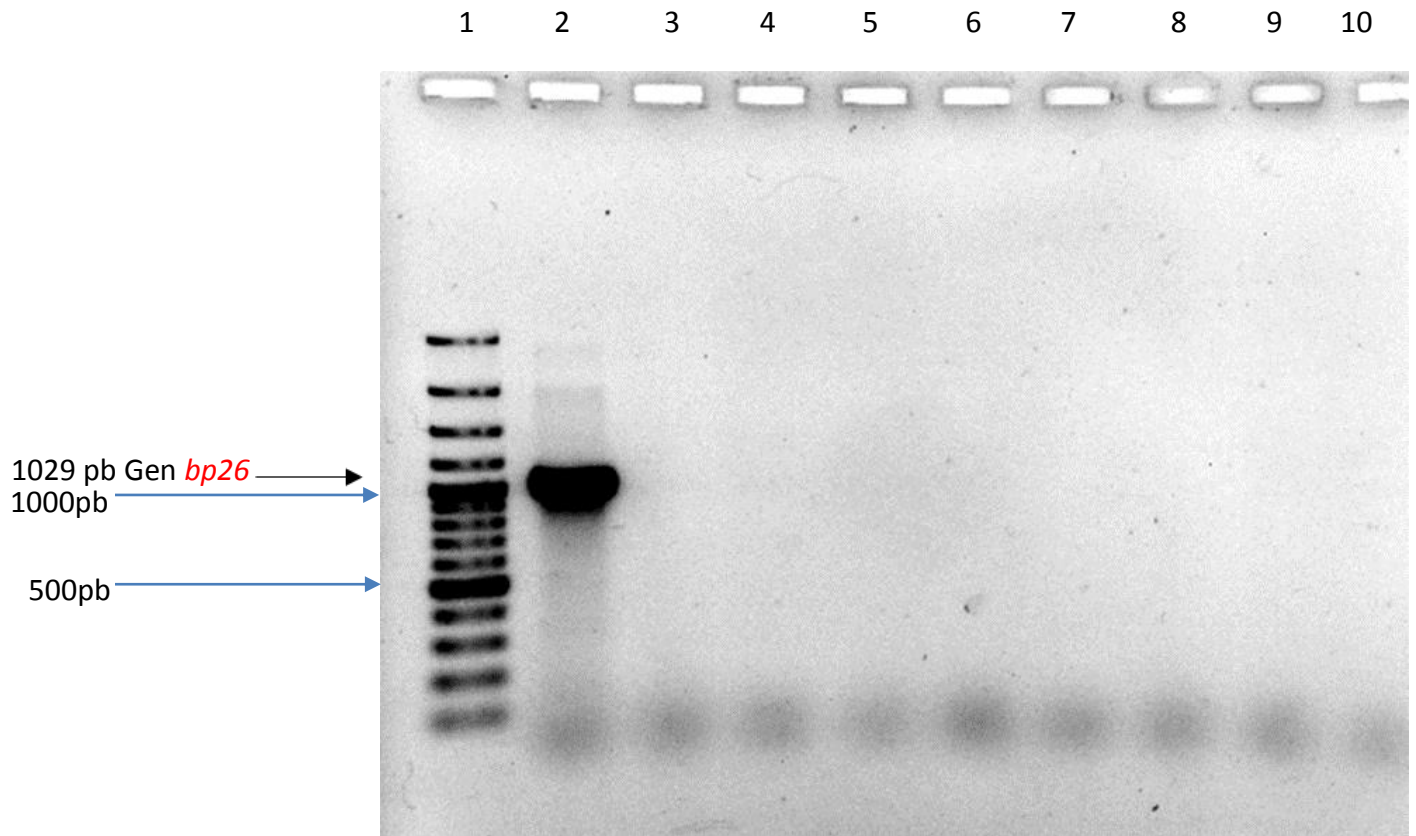


Figura 22. Identificación del gen *bp26* en quesos de vaca. L1, marcador de tamaño molecular; L2, control positivo *Brucella* observándose el amplicón de 1029pb correspondiente al gen *bp26*; L3-L9, DNA de quesos de vaca negativos al gen *bp26*; L10, control negativo.



10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las especies del género *Brucella* causantes de la brucelosis relacionadas al consumo de quesos contaminados son *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, la técnica de PCR múltiple nos permitió poner de manifiesto al gen que diferencia entre estas dos especies, el gen *omp31* con 1071 pb está presente en *B. melitensis* y ausente en *B. abortus*, los resultados obtenidos concuerdan con los que obtuvo Sullivan y colaboradores en 2006 quienes realizaron una PCR múltiple con la finalidad de diferenciar a 6 de las 10 especies de *Brucella*, y reportaron al gen *omp 31* como el gen idóneo para diferenciar a *B. abortus* de *B. melitensis*.

Se realizó una PCR como prueba tamiz para la detección del gen *bp26* identificado como un gen de uso potencial para diagnosticar brucelosis mediante la identificación de *Brucella spp.* en mamíferos apoyado con un estudio realizado por Rossetti y colaboradores quienes confirmaron la presencia de este gen en *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, y *Brucella canis*.

Se corroboró lo ya descrito por López Goñi y colaboradores quienes en 2008 realizaron una PCR múltiple para diferenciar a *Brucella abortus* de *Brucella melitensis* incluyendo cepas patógenas y cepas vacunales, se amplificaron genes compartidos por estas dos especies como lo son los genes *wbo A*, *ery C* y *CPR* de 1682, 587 y 152 pares de bases respectivamente y el gen *omp31* con 1,071 pb que es el gen que las diferencia, utilizándose oligonucleótidos específicos para cada gen.

Se demostró la especificidad de la PCR múltiple para *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* aplicada en DNA de quesos frescos de leche de vaca y cabra mediante la inoculación de una concentración similar a la reportada por Hamdy y colaboradores en 2001 como la mínima para identificar a *Brucella* mediante PCR en leche de animales infectados, demostrándose así que la PCR múltiple es un método específico para la identificación de especies de *Brucella* en quesos frescos de leche de vaca y quesos frescos de leche de cabra, estos reservorios son importantes transmisores de la brucelosis al humano.

Se puso de manifiesto la sensibilidad del método determinando la concentración mínima de DNA extraído a partir de cultivo puro de *Brucella* para amplificar de manera correcta por PCR múltiple los genes de importancia en este trabajo correspondientes a las dos especies de *Brucella* capaz de infectar al ganado bovino, para *Brucella abortus* S19 la concentración mínima a la cual amplificó los genes *wbo A*, *ery C* y *crp* fue de 6 ng/ μ L, para



Brucella melitensis M16 la concentración mínima a la cual amplifico los genes *wbo A*, *omp 31*, *ery C* y *crp* fue de 5.9 ng/ μ L, ya que a una concentración menor a ésta no se amplifican genes mencionados, por lo que no es posible determinar con certeza la especie, semejante a lo reportado en 2005 por Montaña Gómez y colaboradores quienes realizaron una evaluación de la PCR a partir de muestras de leche y cultivos puros de *Brucella* y determinaron que la concentración mínima de DNA para que fuera detectado el gen *wbo A* en *Brucella abortus* es de 5 ng/ μ L, en 2013 por Ruiz Romero y colaboradores quienes realizaron una PCR multiple para la identificación de *Staphylococcus spp* y utilizaron una concentración de DNA de 100 ng/ μ L para su identificación, demostrándose que la PCR es más sensible para la identificación de *Brucella*.

En el presente trabajo no se detectó el DNA de *Brucella* en quesos frescos del 55.5% del total de los mercados muestreados de la ciudad de Puebla por el método de PCR, a diferencia de lo reportado por Villanueva Valencia y colaboradores quienes muestrearon 60 quesos frescos de leche de vaca en mercados del estado de Veracruz y obtuvieron 6.6% de muestras positivas a *Brucella* por el método de PCR. En el estado de Chihuahua Escobedo Morales y colaboradores realizaron un muestreo de quesos y obtuvieron 8 muestras positivas a *Brucella* de 68 por medio de PCR doble. Y concordando con un estudio microbiológico realizado por Nuñez S. en la Universidad de Chile con la finalidad de determinar la calidad sanitaria del queso de cabra artesanal quien no determinó la presencia de *Brucella* en el ganado caprino de la zona muestreada.



11. CONCLUSIONES

1. El DNA genómico bacteriano fue un buen control positivo para la amplificación del gen *bp26* de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*.
2. Se estandarizó la técnica de PCR múltiple para la detección de DNA de *Brucella* en quesos frescos.
3. La técnica de PCR múltiple fue de gran utilidad para la identificación de especies del genero *Brucella* ya que en ambos casos se obtuvo la amplificación de los genes esperados para cada especie.
4. Se determinó la sensibilidad de la PCR múltiple que es de 6 ng/ μ L para *Brucella abortus* y de 5.9 ng/ μ L para *Brucella melitensis*.
5. No se detectó DNA de *Brucella* en las 50 muestras de quesos mediante la técnica de PCR.

RECOMENDACIONES

Como perspectiva para este proyecto es recomendable muestrear el 100% de los mercados para descartar la presencia de *Brucella* en los quesos vendidos en mercados oficiales de la ciudad de Puebla, así como ampliar las muestras a quesos frescos hechos a base de leche de cabra ya que las cabras también son un importante reservorio de *Brucella*.



12. BIBLIOGRAFÍA

- **Acha N., Szyfres P., Szyfres B.** 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición. Volumen I. Bacteriosis y Micosis ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD Publicación Científica y Técnica No. 580; **38-40**
- **Adams G.** 1997. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses. Emerging Infect Dis; **3**: 1-12.
- **Aragón V., Díaz R., Moreno E., Moriyó I.** 1996. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *Brucella sp.* J Bacteriol; **178**: 1070-9.
- **Bercovich.** 1998. Maintenance of *Brucella abortus* free herds: A review with emphasis on epidemiology and the problems of diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. Veterinary Quarterly **20 (3)** : 81-88
- **Castro Dominguez A., Salvatella R., Álvarez C. V. H., Savio M., Olea N. A. M., Ametzoy A. M., González A. S., Moscoso A. V. R., Esteban E., Cuellar J.A., Morán N., Webb L., y Aldigueri S.** 2001. Guía de sistemas de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes. GUIAVETA, segunda edición. Buenos Aires: OPS/ OMS INPPAZ.
- **Castro H., Gonzalez S., Prat M.** 2005. Brucellosis: una revisión práctica. Acta Clínica Bioquímica Latinoamericana; **205**
- **Cloekaert A., Tibor A., Zygmunt MS.** 1999. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin Diagn Lab Immunol; **6**: 627-9.
- **Conde S., Hollender D., Salustio E., Samartino L.** 2007. *Desarrollo de PCR multiplex para la identificación de Brucella sp.* XI Congreso Argentino de Microbiología.
- **Contreras-Rodriguez A., Naguib S., G. G. Schurig., N. Sriranganathan., Boyle S. M., Lopez-Merino A.** 2006. Cloning, expression and characterization of immunogenic aminopeptidase from *Brucella melitensis*. Infect Immun, **71**:38-44
- **García D., Marín C., M Miguel., Muñoz P., Vizmanos J., López I.** 2006. Multiplex PCR assay for the identification of all *Brucella* species and the vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev 1. Clinical Chemistry; **52**: 779-781
- **González Villarreal M.** 2002. Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt, Soná, Veraguas, República de Panamá: **2-4**



- **Hamdy M., Amin A.** 2001 Detection of *Brucella* Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *Vet J*, **163**: 299-305.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10995620> omp31 outer membrane protein, 31 kDa [*Brucella pinnipedialis* B2/94]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12282568> wboA glycosyltransferase [*Brucella melitensis* M28]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3339599> omp28 Omp28, immunoreactive 28 kDa outer membrane protein [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3341348> eryC EryC, D-erythrulose-1-phosphate dehydrogenase [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3341442> BruAb2_0787 Crp/Fnr family transcriptional regulator [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941]
- Instituto de Investigaciones Biomédicas-IDIBAM. 2008. Fundamentos y Etapas De La Reacción En Cadena De La Polimerasa PCR. *Revista alimentaría N°383 mayo 2007*, 90-91
- **J. Corbel M.** 2006. World Health Organization. Brucellosis in Humans and Animals. www.who.int/reserch
- **Jinlang Q., Wenjing W., Jingbo W., Hui Z., Yuanzhi W., Jun Q., Chuangfu C., Goege F., Gao., Jean-Pierre A., Chengyao L.** (2012). Characterization of Periplasmic Protein *bp26* Epitopes of *Brucella melitensis* Reacting with Murine Monoclonal and Sheep Antibodies, Department of Transfusion Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, China. 10.1371/journal.pone.0034246
- **López Merino A., Ocampo S., Monroy A., Domínguez H.** 1991. Brucellosis, avances y perspectivas, publicación técnica INDRE, SSA, México D.F.
- **López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C. M., De Miguel M. J., Muñoz P. M., Blasco J. M., Jacques I., Grayon M., Cloeckert A., Ferreira A., Cardoso R. C., Correa de Sá M. I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B.** 2008. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *J Clin Microbiol*; **46(10)**: 3484–3487
- **Moreno E., Speth S., Jones L., Berman D.** 1981. Immunochemical characterization of *Brucella* lipo-polysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun*; **31**: 214-22.
- **Nicoletti P., J E., Corbel M.** 1989. Relación entre enfermedades animales y humanas. Brucellosis: Clínica y aspectos de Laboratorio CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. **41-52**.
- **Nielsen K.** 2012. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2012. Brucellosis bovina. Capítulo 2.4.3: 18
- **Nielsen K., Duncan R.** 1990. Animal Brucellosis. Taylor & Francis.



- **Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E.** 2005. Brucellosis. *N Engl J Med*; **352(22)**: 2325 - 2336.
- **Pérez de Castro A.** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), universidad politécnica de Valencia, Biotecnología, ETSIAMN
- **Pizarro-Cerda J., Meresse S., Parton R., Van der Goot G., Sola-Landa A., Lopez-Goni I.** 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*; **66(12)**: 5711-24.
- **Rossetti O., Arese A., Boschioli M., Cravero S.** 1996. Cloning of *Brucella abortus* Gene and Characterization of Expressed 26-Kilodalton Periplasmic Protein: Potential Use for Diagnosis. *Journal of clinical microbiology*; Vol. 34: 165-169.
- **Ruiz C.** 1986. Brucelosis, diagnóstico diferencial, pruebas de laboratorio, métodos de identificación, complicaciones, terapéutica y descripción clínica (3ª ed.) México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Salhi I., Boigegrain R., Machold J., Weise C., Cloeckert A., Rouot B.** 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun*; **71(8)**: 4326-32.
- **Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.** 1989. «Gel electroforesis of DNA» en: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, capítulo 6.
- **Santambrosio E.** reacción en cadena de la polimerasa, Universidad Tecnológica Nacional
- **Sullivan D. J. Jr., Tripathi A. K., Black R. E., S. Sazawal.** 2006. Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry* 52, No. 4: **779-781**
- **Torres Vitela M., Castillo Ayala A.** 2010. Agentes patógenos transmitidos por alimentos, volumen II, universidad de Guadalajara, segunda edición, pág. **89, 115**
- **Vemulapalli R., McQuiston J., Schuring G., Sriragananthan N., Halling S., Boyle S.,** 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR Assay to Distinguish strain RB51 from Other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* **6 (5)**: 760-764.
- **Westermeier R.** 1997. *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.
- **Young Edward J., Corbel Michael J.** 1989. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects* Taylor & Francis.
- **Zygmunt M., Blasco J., Letesson J., Cloeckert A., Moriyón I.** 2009. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide gene reveals marked



differences in O- polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. BMC Microbiology; **9**: 92